

**RENATA SOUZA AGOSTINHO COSTA**

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO NA INIBIÇÃO  
DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MASTOCITOMA  
PELO ÓXIDO NÍTRICO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: *Prof. Dr. Jamil Assreuy***

**Florianópolis - SC**

**2001**

**“ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO NA INIBIÇÃO  
DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MASTOCITOMA  
PELO ÓXIDO NÍTRICO”.**

**POR**

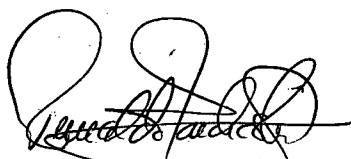
**RENATA SOUZA AGOSTINHO COSTA**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela  
Banca Examinadora, composta pelos membros:**

**Prof. Dr. Edson Antunes  
(Depto. de Farmacologia/UNICAMP)**

**Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha  
(Depto. de Farmacologia/USP-RP)**

**Prof. Dr. Giles Alexander Rae  
(Depto. de Farmacologia/UFSC)**



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 20 de agosto de 2001.**

**Este trabalho é dedicado especialmente ao meu filho,  
Flávio Neto.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela orientação na realização deste trabalho e, principalmente, pela oportunidade de compartilhar do seu conhecimento.

A todos os docentes do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela colaboração e conhecimentos transmitidos. Em especial ao Prof. Dr. João Batista Calixto pela concessão de drogas e equipamentos imprescindíveis à realização deste trabalho.

A Márcia Terluk pela paciência e pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, por quem guardo admiração e amizade.

Aos demais amigos do Laboratório de Óxido Nítrico: Adriane Madeira, Alexandre Meyer, Daniel Fernandes, Danielle Duma, José Eduardo da Silva Santos, Emiliana Cunha, Maria Cláudia Santos da Silva, Rafael Prim e Rodrigo Quintanilha Vêras pela agradável convivência.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tânia Saleh do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina pela inestimável amizade e incentivo para meu ingresso neste programa de pós-graduação e a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, e em especial ao meu filho Flávio que mesmo sofrendo a constante ausência materna nos últimos dois anos, demonstrou neste sentido, compreensão durante quase todo o tempo.

Ao meu esposo, Marcílio, que sempre dividiu todas as responsabilidades relacionadas a nossa casa e ao nosso filho e, principalmente, supriu a minha ausência no lar, disponibilizando a maior parte do meu tempo para que fosse possível a realização deste trabalho.

Agradeço ainda a um ser supremo, que de alguma maneira deve ter me dado forças para continuar meu caminho em busca do meu crescimento pessoal e a concretização de mais este sonho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Validação do método de coloração com cristal violeta em comparação com a contagem direta em câmara de Neubauer.....	35
Figura 2 - Efeito do óxido nítrico na proliferação e na viabilidade da linhagem celular P815 (mastocitoma de camundongo).....	37
Figura 3 - Fotografia de células P815 após tratamento com SNAP.....	38
Figura 4 - Efeito do SNAP na proliferação de linhagens de mastocitoma de camundongo, P815 e MCP-5.....	39
Figura 5 - Comparação do efeito de SNAP, GSNO e SNP na proliferação de células P815.....	42
Figura 6 - Reversibilidade do efeito anti-proliferativo do óxido nítrico em células P815.....	45
Figura 7 - Cinética de liberação de óxido nítrico por SNAP na presença e ausência de células P815.....	46
Figura 8 - Efeito de bloqueadores de subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem P815 induzida por óxido nítrico.....	49
Figura 9 - Efeito de bloqueadores de canais de potássio na irreversibilidade do efeito anti-proliferativo do NO.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características das Óxido Nítrico Sintases (NOS) .....	11
Tabela 2	- Efeito da N-acetil-penicilamina (NAP), da glutathiona reduzida (GSH) e do doador de peroxinitrito (SIN-1) na proliferação da linhagem P815. ....	40
Tabela 3	- Influência do inibidor da guanilato ciclase (ODQ) na diminuição da proliferação da linhagem P815 induzida por SNAP.....	44
Tabela 4	- Efeito da citocalasina B e da colchicina na diminuição da proliferação da linhagem P815 induzida por SNAP.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	- 4-aminopiridina
ADP	- Difosfato de adenosina
ATP	- Trifosfato de adenosina
cAMP	- Monofosfato cíclico de adenosina
CDK	- Quinase dependente de ciclina
cGMP	- Monofosfato cíclico de guanosina
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChTx	- Caribdotoxina
CKIs	- Inibidores de quinase dependente de ciclina
cNOS	- Óxido nítrico sintase constitutiva
Cy	- Cicloheximida
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDHF	- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio
EGF	- Fator de crescimento epidermal
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	- Dinucleotídeo de flavina
FMN	- Mononucleotídeo de flavina
GSH	- Glutathiona reduzida
GSNO	- S-nitrosoglutathiona
GTP	- Trifosfato de guanosina
IbTx	- Iberiotoxina
IFN	- Interferon
IL-1	- Interleucina-1
IL-2	- Interleucina-2
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
K <sub>ATP</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> ATP-dependente
K <sub>Ca</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> dependente de cálcio
K <sub>IR</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> retificador de influxo

K <sub>v</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> dependente de voltagem
LB	- Linfócito B
LT	- Linfócito T
M	- Mitose
mRNA	- RNA mensageiro
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetil tetrazóico
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NAP	- N-acetil-DL-penicilamina
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO	- Óxido nítrico
NO <sup>-</sup>	- Anion nitroxil
NO <sup>+</sup>	- Cátion nitrosônio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Íon Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- Íon Nitrato
NOS	- Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Ânion superóxido
ODQ	- 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1ona
ONOO <sup>-</sup>	- Ânion peroxinitrito
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaqueta
Rb	- Retinoblastoma
RSNO	- S-nitrosotiol
SCG	- Guanilato ciclase solúvel
SH-	- Sulfidrila
SIN-1	- 3-morfolinil sidnonimina
CML	- Célula muscular lisa
SNAP	- S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNP	- Nitroprussiato de sódio
TEA	- Tetraetilamônio
THB <sub>4</sub>	- Tetrahidrobiopterina
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral- $\alpha$
VIP	- Peptídeo vasoativo intestinal



## RESUMO

Óxido nítrico (NO) inibe a proliferação de células normais e tumorais. Vários efeitos do NO devem-se à ativação de guanilato ciclase ou alteração do funcionamento de canais de potássio, mecanismos que participam na proliferação e na diferenciação celular. Neste estudo, nós investigamos o envolvimento destes mecanismos no efeito anti-proliferativo do NO em duas linhagens de mastocitoma murinas. O NO (em forma de doadores SNAP 10-100  $\mu\text{M}$  e GSNO 100-1000  $\mu\text{M}$ ) inibiu de maneira concentração e tempo-dependente a proliferação da linhagem celular P815, com efeito máximo em torno de 50%, induzindo uma interrupção do ciclo celular na fase de mitose, com predomínio de células em metáfase. As células incubadas com o doador de NO por 4 ou 24 h tiveram a proliferação inibida da mesma forma, indicando que o efeito causado pelo NO é irreversível. Os bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  tetraetilamônio (TEA; bloqueador não-seletivo; 10-1000  $\mu\text{M}$ ); 4-aminopiridina (4-AP; bloqueador de canais sensíveis à voltagem; 1-100  $\mu\text{M}$ ) e as toxinas caribdotoxina, iberiotoxina e apamina (bloqueadores de subtipos de canais de potássio dependentes de cálcio; 100 nM), reverteram completamente o efeito anti-proliferativo do NO. Entretanto, o bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  ATP-dependentes (glibenclamida; GBN; 10-1000  $\mu\text{M}$ ) não alterou a inibição da proliferação induzida pelo NO. O efeito do NO não foi mimetizado pelo 8-Br-cGMP (um análogo permeante do cGMP), nem alterado por um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (ODQ; 1-10  $\mu\text{M}$ ). Drogas que interferem com o citoesqueleto não afetaram o efeito anti-proliferativo do NO. Conclui-se, assim, que o NO inibe a proliferação celular irreversivelmente por uma via dependente de canais de potássio, porém independente da atividade da enzima guanilato ciclase e do citoesqueleto.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) inhibits tumor and normal cell proliferation. Several of the described effects of NO are related to its ability to stimulate soluble guanylate cyclase or to interfere with potassium channel functioning. Since both events (guanylate cyclase and potassium channels) are involved in cell proliferation and differentiation, we have investigated the role of these two signalling events in the anti-proliferative effect of NO in two murine mastocytoma cell lines. NO (in the form of NO donors; SNAP 10-100  $\mu\text{M}$  and GSNO 100-1000  $\mu\text{M}$ ) inhibited concentration and time-dependently the proliferation of P815 cell line ( $E_{\text{Max}}$  around 50%) inducing a growth arrest in M phase, mainly in metaphase. Cells incubated with NO donor for 4 or 24 h had the proliferation equally inhibited, indicating that the NO effect is irreversible. The potassium channels blockers tetraethylammonium (TEA; a non-selective blocker; 10–1000  $\mu\text{M}$ ); 4-aminopyridine (4-AP; a blocker of voltage-sensitive; 1–100  $\mu\text{M}$ ) and the toxins charybdotoxin, iberiotoxin e apamin (blockers of the calcium-dependent subtypes channels 100 nM) completely reversed NO-induced anti-proliferative effect. However, the ATP-dependent channel blocker glibenclamide (GBN; 10–1000  $\mu\text{M}$ ) failed to affect NO-induced anti-proliferative effect. The effects of NO were not mimicked by 8-Br-cGMP (a permeant analogue of cGMP) or affected by a selective inhibitor of soluble guanylate cyclase (ODQ; 1-10  $\mu\text{M}$ ) or compounds which interfere with the cytoskeleton. In conclusion, NO inhibits cell proliferation irreversibly via potassium channels but independently of guanylate cyclase activation or changes in the cytoskeleton.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE .....	vii
<b>I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>2</b>
1.1. Aspectos gerais.....	2
1.2. Aspectos da regulação da proliferação.....	4
<b>2. ÓXIDO NÍTRICO.....</b>	<b>6</b>
2.1. Histórico.....	6
2.2. Química e enzimologia.....	7
2.3. Alvos moleculares e ações.....	11
2.4. NO e proliferação celular.....	16
<b>3. CANAIS DE POTÁSSIO.....</b>	<b>18</b>
3.1. Importância.....	18
3.2. Tipos.....	19
3.3. Canais de potássio e proliferação celular.....	23
<b>II - OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>III - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Linhagens de células.....	28
3.2. Ensaio de proliferação celular pelo método do cristal violeta.....	28
3.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.....	30
3.4. Índice mitótico.....	31
3.5. Cinética de liberação de óxido nítrico por doadores de NO.....	31
3.6. Compostos e meio de cultura .....	31
3.7. Análise estatística.....	32
3.8. Soluções.....	33
<b>IV - RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>

4.1. Validação da medida de proliferação celular pelo método do cristal violeta.....	35
4.2. Efeito do óxido nítrico na proliferação celular.....	36
4.3. Estudo comparativo de doadores de óxido nítrico na proliferação de células da linhagem P815.....	40
4.4. Efeito do peroxinitrito na proliferação da linhagem P815.....	43
4.5. Participação da via da guanilato ciclase solúvel no efeito anti-proliferativo do óxido nítrico.....	43
4.6. Reversibilidade do efeito anti-proliferativo do óxido nítrico.....	44
4.7. Envolvimento do citoesqueleto no efeito anti-proliferativo do óxido nítrico.	46
4.8. Envolvimento de canais de potássio no efeito anti-proliferativo do óxido nítrico.....	47
<b>V - DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular é um evento básico na fisiologia de organismos multicelulares. Esta função celular depende de diversos e complexos sistemas de controle, sendo particularmente importante para o crescimento e substituição de células danificadas, funcionalmente deficientes ou perdidas durante o processo de apoptose (morte programada).

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

Em organismos unicelulares, onde cada divisão celular gera um novo indivíduo, a seleção natural favorece as células que crescem e se dividem mais rapidamente, sobrevivendo as melhores. Este tipo de proliferação está restrito à disponibilidade de nutrientes e ao acasalamento sexual. Por outro lado, em espécies multicelulares a seleção natural age no organismo como um todo, mantendo-o sob uma organização submetida a um controle rígido que limita a proliferação celular. No adulto, existem momentos em que as células podem não crescer ou dividir-se, mas permanecer em estado de repouso proliferativo (a assim chamada fase  $G_0$ ), realizando funções especializadas enquanto não sofrem divisão celular. Mesmo com abundância de nutrientes nos tecidos de um organismo multicelular, em certas circunstâncias suas células precisam parar de proliferar, ao contrário de leveduras ou bactérias que proliferam rapidamente em função única da disponibilidade de nutrientes. Em um organismo multicelular as células recebem, além de nutrientes, sinais positivos específicos de outras células para crescer e dividir. Estes sinais são proteínas chamadas de fatores de crescimento que se ligam a receptores de membranas plasmáticas para estimular positivamente a proliferação celular e anular

controles negativos intracelulares que possam restringir o crescimento e bloquear a ocorrência do ciclo celular. Assim, enquanto uma levedura bem nutrida se prolifera sempre, a menos que receba um sinal negativo para entrar em repouso proliferativo, uma célula animal sempre repousa a menos que receba um sinal positivo para proliferar.

O estudo sobre a divisão e o ciclo celular iniciou-se com o desenvolvimento do microscópio, no século 17, seguido da teoria e aplicação da preparação e fixação de amostras no século 19 (Magner, 1992; Ford, 1998). O progresso quanto ao entendimento da biologia molecular do ciclo celular foi relativamente pequeno até 1953, quando se observou que a síntese de DNA ocorria num determinado período discreto da divisão celular, entre a mitose e a fase S. O ciclo celular foi então dividido em quatro fases distintas:  $G_1$ , S,  $G_2$  e M. A fase  $G_1$  (Gap 1), é caracterizada pelo intervalo entre o término da mitose e início da replicação do DNA, a fase S (síntese) correspondente àquela em que ocorre replicação do DNA, a fase  $G_2$  (Gap 2), compreende o intervalo entre o final da síntese de DNA e início da mitose e a fase M é aquela em que acontece a divisão celular (Howard & Pelc, 1953). Na mitose (fase M) o processo de divisão nuclear culmina com a divisão da célula original em duas células-filhas. No crescimento de células eucarióticas em cultura, este período ocorre em aproximadamente 30 min. Outro período do ciclo celular, que é muito mais longo, é a interfase, no qual a célula cresce e replica o DNA, atravessando as fases  $G_1$ , S e  $G_2$  que duram em média e respectivamente períodos de 12, 6 e 4 h, embora a duração exata de cada período varie com diferentes organismos e tipos celulares (Murray & Hunter, 1993). Assim, o ciclo celular dura em média 12 horas para tecidos de rápido crescimento, em mamíferos.

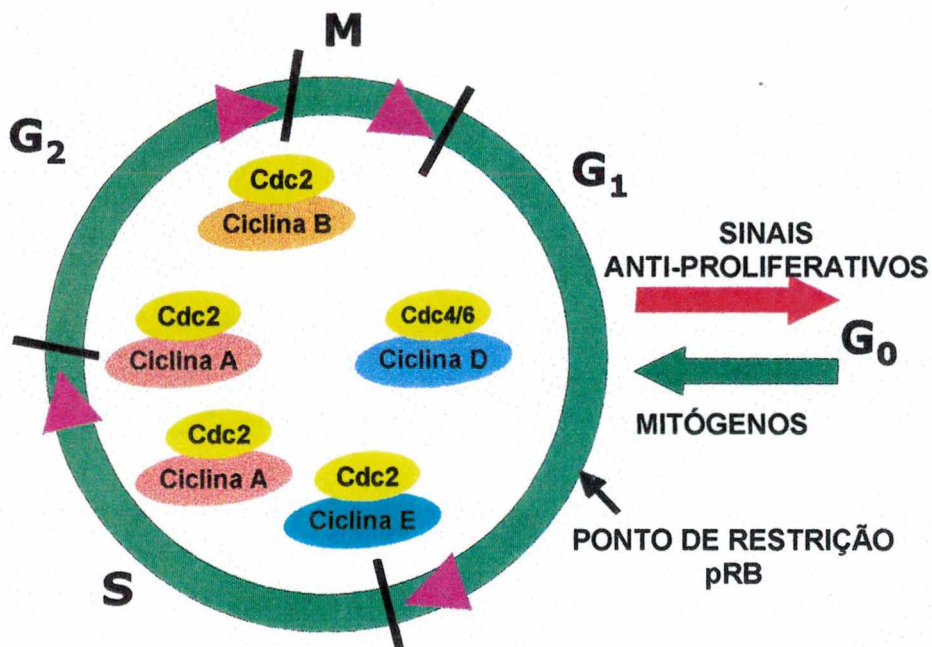
O ciclo de divisão celular é governado por complexos de proteínas de atividade variável, tanto espacialmente como temporalmente (Murray, 1992). O núcleo de cada complexo é composto de uma ciclina, subunidade proteica regulatória essencial e de uma quinase dependente de ciclina (CDK, *cyclin dependent kinase*) que se comporta como a subunidade catalítica do complexo (Esquema 1). A atividade do complexo CDK/ciclina é regulada por eventos coordenados, incluindo a indução e degradação da subunidade ciclina, a ativação e fosforilação inibitória da subunidade CDK e a ligação de inibidores de CDK (CKIs) ao complexo formado (Morgan, 1995). A fosforilação de substratos regula a extensão de cada fase do ciclo celular, a transição para a próxima fase e constitui parte da via de sinalização para *checkpoints* (pontos de verificação). A integridade destes *checkpoints* é crucial à sobrevivência e integridade celular, por manter a estabilidade genética.

## 1.2. ASPECTOS DA REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO

Estímulos endógenos e exógenos convergem em múltiplos mecanismos que controlam o ciclo celular. As vias que governam as diferentes fases do ciclo celular são importantes na decisão entre a síntese de DNA e proliferação *versus* parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose da célula. Estas vias têm a participação de vários oncogenes (tais como *c-myc*, *c-fos* e *c-jun*) e genes supressores de tumores (tal como o gene de retinoblastoma, *Rb*). A normalidade de uma célula diplóide depende da sua estabilidade genética, pois se sabe que a perda ou inativação de ambas as cópias de um gene supressor de tumor ou a ativação de apenas uma cópia de um oncogene podem aumentar a instabilidade genética, ocasionando uma



proliferação celular aberrante. Assim, percebe-se que os estímulos decisórios de proliferação/parada podem culminar, com relativa facilidade, em genes que se tornam alvos centrais para alterações genéticas, podendo levar ao câncer.



Esquema 1 – Representação esquemática dos quatro períodos do ciclo celular, incluindo os complexos ciclina/quinase que regulam a progressão através de cada período (Modificado de Shackelford *et al.*, 2000).

## 2. ÓXIDO NÍTRICO

### 2.1. HISTÓRICO

Mitchell e colaboradores, em 1916 (*apud* Morris & Timothy, 1994) sugeriram que mamíferos produziam óxidos de nitrogênio, mas esta observação foi ignorada até 1981, quando o grupo de Tannenbaum mostrou que havia produção de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) em mamíferos, e que isto estava correlacionado com a carcinogênese. Além disso, animais ou humanos injetados com endotoxina bacteriana ou padecendo de infecções também mostravam níveis aumentados de  $\text{NO}_3^-$  na urina (Green *et al.*, 1981a e b).

Em 1980, foi demonstrado o fenômeno de relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina na musculatura lisa vascular em aorta de coelho (Furchgott & Zawadzki, 1980). Este efeito era mediado por um fator humoral, o qual mais tarde foi reconhecido como fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor* ou EDRF; Cherry *et al.*, 1982).

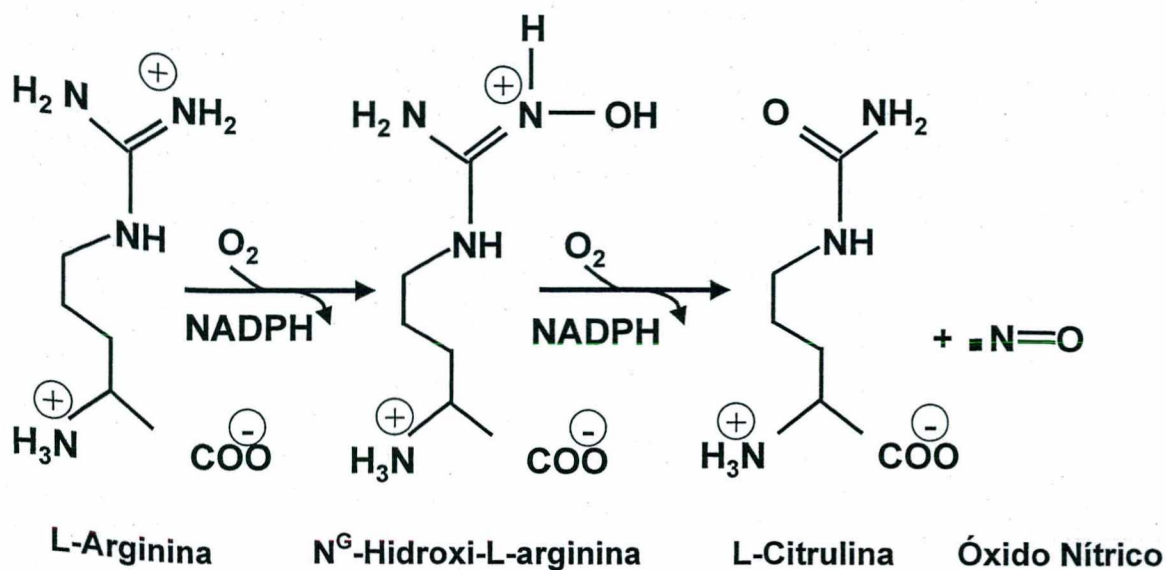
A síntese de óxidos de nitrogênio por células específicas de mamíferos foi demonstrada primeiramente por Stuehr & Marletta em 1985, mostrando que macrófagos ativados de camundongo liberavam  $\text{NO}_3^-$ . Hibbs *et al.*, (1987), relataram que a L-arginina era o substrato para síntese de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  (ânions nitrato e nitrito, respectivamente) em macrófagos murinos e que esta conversão era necessária para sua citotoxicidade contra certas linhagens de células. Palmer, Ferridge & Moncada (1987), demonstraram que o EDRF e o óxido nítrico (NO) possuíam as mesmas características biológicas e químicas. No mesmo ano, Ignarro e colaboradores sugeriram que o NO era o fator relaxante derivado do endotélio descrito por Furchgott & Zawadzki em 1980 e um ano mais tarde esses mesmos autores



demonstraram que o EDRF e o NO apresentavam as mesmas propriedades químicas e farmacológicas (Ignarro *et al.*, 1988). Ainda em 1988, o grupo de Moncada mostrou que a L-arginina era substrato para a produção de NO em células endoteliais (Palmer *et al.*, 1988), fato este confirmado posteriormente por diferentes pesquisadores (Marletta *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989a). Assim, ficou claro que o NO era o intermediário biologicamente ativo da via de formação de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  a partir de L-arginina. Em seguida, análogos da L-arginina foram reconhecidos como inibidores da via de formação de NO, tornando-se ferramentas úteis para o estudo dos efeitos fisiológicos e patológicos desta molécula.

## 2.2. QUÍMICA E ENZIMOLOGIA

Em mamíferos, o NO é enzimaticamente sintetizado em várias células (fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, por exemplo) de diferentes tecidos. Embora constitua uma molécula gasosa pequena (peso molecular de 30) e tenha vida média curta (5-10 seg; Palmer *et al.*, 1987), o NO tem uma grande importância biológica por atuar como molécula sinalizadora em diversos processos fisiológicos, como neurotransmissão, memória, aprendizagem e regulação do tônus vascular, para exemplificar alguns. O NO é formado em quantidades estequiométricas pela conversão da L-arginina em L-citrulina, sob a ação enzimática da NO sintase (NOS; Esquema 2). Esta reação envolve o NADPH e o oxigênio molecular como co-substratos, a tetrahydrobiopterina (THB4), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN) como co-fatores, além da calmodulina como ativador alostérico da NOS (para revisão ver Crane *et al.*, 1997; Mayer & Hemmens, 1997).



Esquema 2 – Biossíntese do óxido nítrico (NO).

São caracterizadas hoje três isoformas distintas de NOS: NOS endotelial (eNOS; enzima constitutiva inicialmente encontrada no endotélio vascular), NOS neuronal (nNOS; enzima constitutiva inicialmente encontrada em células neuronais) e NOS induzida (iNOS; expressa em diferentes tipos celulares em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios), cada uma sendo o produto de um único gene. Os genes que codificam as NOS humanas estão localizados nos cromossomos 7 (eNOS), 12 (nNOS) e 17 (iNOS), e são denominados respectivamente de *nos1*, *nos2* e *nos3* (Mayer & Hemmens, 1997). Verifica-se uma alta homologia (~ 90%) entre as NOS encontradas em diferentes espécies. As três isoformas humanas são encontradas na forma de dímeros quando ativas e



apresentam uma seqüência de aminoácidos muito semelhante, com homologia de aproximadamente 55% entre si, possuindo regiões conservadas tais como um domínio C-terminal redutase contendo sítios de ligação à calmodulina, FMN, FAD e NADPH e outro domínio N-terminal oxidase que contém sítios de ligação à tetrahydrobiopteridina, ferro-protoporfirina (heme) e ao substrato L-arginina (para revisão ver Mayer & Andrew, 1998), que corresponde ao sítio catalítico. A ativação das três isoformas depende da modificação alostérica causada pela ligação com a calmodulina, que, por sua vez, tem sua atividade regulada pela presença de cálcio. Apenas a eNOS e a nNOS dependem da elevação das concentrações de cálcio intracelular, uma vez que a iNOS é capaz de ligar-se à calmodulina com alta afinidade, mesmo em baixa concentração intracelular de cálcio. Logo, as atividades das eNOS e nNOS são moduladas pelas variações do cálcio intracelular, porém o mesmo não ocorre com a iNOS (Moncada *et al.*, 1991).

As três isoformas diferem na localização subcelular, na seqüência de aminoácidos, na sua regulação e no seu papel funcional (Tabela 1). Duas dessas enzimas estão continuamente presentes e por isso são denominadas de NOS constitutivas (cNOS). Fazendo parte deste grupo de enzimas encontramos a eNOS que pode estar presente tanto em células do endotélio vascular como em plaquetas e algumas populações neuronais, e a nNOS em células neuronais e extraneuronais como músculo esquelético, epitélio bronquiolar e de traquéia. Quando as células que contém estas enzimas são estimuladas da forma adequada, as NOS são ativadas e assim permanecem durante curtos períodos de tempo, gerando concentrações extracelulares da ordem de picomolar de NO, que serve como um sinal difusível mediando vários processos fisiológicos, incluindo vasodilatação e neurotransmissão

central e periférica. A terceira enzima normalmente não é encontrada em células e tecidos antes que estes tenham sido induzidos à expressá-la. Os estímulos que induzem a expressão da iNOS seriam processos imunológicos ou inflamatórios mediados por citocinas (TNF, IFN, IL-1), bactérias, protozoários ou fungos. A iNOS produz NO em altas concentrações (na ordem de nanomolar a micromolar) e por longos períodos. No sistema imune, macrófagos ativados produzem NO e outros óxidos de nitrogênio que exercem efeito citostático ou citotóxico contra células tumorais (Stuehr *et al.*, 1989b), além de atividade antimicrobica contra certos patógenos invasivos (Nathan, 1992; Liew *et al.*, 1990). O NO liberado por esta via também contribui para o desenvolvimento de certas patologias incluindo o choque séptico e algumas formas de inflamação aguda e crônica. Embora a nomenclatura das isoformas das NOS seja baseada nos tecidos originais de onde elas foram originalmente purificadas, hoje se sabe que há uma considerável dispersão da localização das NOS. Assim, a eNOS pode ser encontrada tanto em células do endotélio vascular como em plaquetas e algumas populações neuronais. Já a nNOS é encontrada no epitélio dos brônquios e traquéia e músculo esquelético. Enquanto a expressão de eNOS e a nNOS possa ser induzida em certas condições como exercício crônico, lesões em nervos e na gravidez, a iNOS pode estar presente constitutivamente em alguns tecidos, incluindo epitélio brônquico de humanos, rins de ratos e tecidos fetais (para revisão ver Moncada *et al.*, 1997; Michel & Feron, 1997; Cooke & Dzau, 1997).



Tabela 1 – Características das enzimas óxido nítrico sintases (NOS)

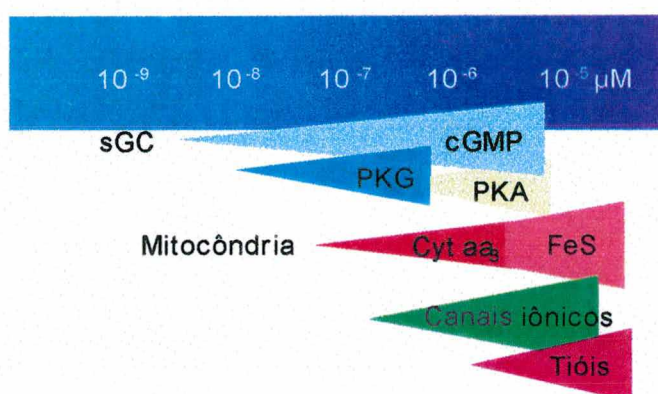
Enzimas Constitutivas (cNOS)		Enzima Induzida (iNOS)
eNOS	nNOS	iNOS
Citosólica ou ligada à membrana	Citosólica	Citosólica ou ligada à organelas
134 kDa	160 kDa	130 kDa
Dependente de NADPH	Dependente de NADPH	Dependente de NADPH
Dependente de THB <sub>4</sub>	Dependente de THB <sub>4</sub>	Dependente de THB <sub>4</sub>
Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica
Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina
Dependente de Ca <sup>+2</sup> /calmodulina	Dependente de Ca <sup>+2</sup> /calmodulina	Independente de Ca <sup>+2</sup> /calmodulina
pmol de NO produzido	pmol de NO produzido	nmol de NO produzido
Efeito de curta duração	Efeito de curta duração	Efeito de longa duração
Cromossomo 7	Cromossomo 12	Cromossomo 17
mRNA com 4.4 Kb	mRNA com 10.5 Kb	mRNA com 4 Kb

### 2.3. ALVOS MOLECULARES E AÇÕES

Diferente de outros mediadores biológicos que exercem suas funções por interagirem com seus respectivos receptores, o NO induz respostas que não mostram características de saturação. O NO é uma molécula anfipática que se difunde pela membrana celular, percorrendo vários diâmetros até interagir com sistemas biológicos por meio de efeitos diretos ou indiretos. É importante realçar que os efeitos do NO nos sistemas biológicos são dependentes da sua concentração e dos alvos moleculares da célula, como ilustrado no Esquema 3. São ditos efeitos

diretos, as reações entre o NO e determinadas moléculas biológicas, como proteínas contendo metais em grupamentos prostéticos (NOS, CG, ciclooxigenase) ou grupamentos tióis. Já os efeitos indiretos correspondem às reações do NO com o ânion superóxido e o oxigênio formando espécies reativas de nitrogênio (RNS).

### ATIVACÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO



Esquema 3 – Concentração do NO e ativação das vias de sinalização celular (Modificado de McAndrew *et al.*, 1997).

### Efeitos Diretos

Os efeitos diretos do NO geralmente ocorrem em baixa concentração local ( $< 5 \mu\text{M}$ ), ligando-se preferencialmente ao ferro do grupamento heme da guanilato ciclase (CG) e conseqüentemente, promovendo a ativação desta enzima. A enzima guanilato ciclase catalisa a conversão de GTP em cGMP, que por sua vez medeia uma cascata de sinalização envolvida na regulação de processos fisiológicos e patológicos. Compostos endógenos e exógenos incluindo autacóides, hormônios,



neurotransmissores e toxinas, induzem resposta celular via cGMP e por ser o NO o maior modulador da atividade da guanilato ciclase, muitos dos seus efeitos fisiopatológicos se dão através desta modulação, como por exemplo: motilidade do músculo liso vascular, agregação plaquetária, crescimento e proliferação de linhagens celulares, choque endotoxêmico e diarreia crônica.

Dois grupos independentes, em 1977, demonstraram que nitratos orgânicos induziam um aumento dose-dependente nos níveis de cGMP em músculo liso (Schultz *et al.*, 1977; Katsuki *et al.*, 1977). Estes estudos foram confirmados quando foi mostrado bioquimicamente que todos os nitrovasodilatadores e o NO ativavam uma guanilato ciclase solúvel (Murad *et al.*, 1978; Kukovetz, 1979). Atualmente entende-se que uma ativação da guanilato ciclase solúvel por nitrovasodilatadores induz o aumento dos níveis de cGMP e conseqüentemente, a fosforilação proteica que está associada ao relaxamento do músculo liso. Assim, o NO pode ser considerado um nitrovasodilatador endógeno (Moncada *et al.*, 1988), uma vez que o sistema cardiovascular encontra-se em constante vasodilatação dependente da geração desta molécula.

O NO reage com o grupamento heme da enzima sCG formando o complexo nitrosil-heme pentacoordenado e alterando a configuração do anel porfirínico, responsável pela indução do estado ativado da enzima, aumentando, assim, a conversão de GTP em cGMP (Ignarro *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1984; para revisão ver Ignarro *et al.*, 1994).

Embora a CG seja o alvo efetor endógeno do NO mais estudado na literatura, existem outras proteínas contendo metais e grupamentos tióis que também podem servir de alvo de interação para o NO, levando ou não a importantes efeitos

biológicos. Pode-se citar como exemplos a interação do NO com o grupamento heme da hemoglobina originando a metahemoglobina, e a interação do NO com a oxhigemoglobina convertendo o NO à nitrato por meio de uma reação oxidativa. Estes eventos contribuem para a inativação do NO.

O grupamento sulfidril (SH-) também é um importante alvo para os efeitos biológicos do NO devido à formação de S-nitrosotióis (RSNO). Vários trabalhos despertaram o interesse sobre a interação tiol-NO: i. reações com tióis celulares contribuem para a bioatividade de certos doadores farmacológicos de óxido de nitrogênio (Ignarro, 1981), ii. RSNO exerciam bioatividade independente da liberação de NO (Kowaluk e Fung 1990), iii. a presença de RSNO em células de mamíferos em condições fisiológicas liberam  $\text{NO}^+$  e  $\text{NO}^-$ , formas redox de NO distintas, que exibem variações quanto à reatividade química de outros doadores de NO (Stamier *et al.*, 1992a). A forma oxidada do NO, o  $\text{NO}^+$  ou íon nitrosônio, é a responsável pelo grande número de reações eletrofílicas, especialmente a reação de R-SNO. Quimicamente o  $\text{NO}^+$  pode ser transferido de um tiol para outro, processo chamado de transnitrosilação. Por outro lado, o  $\text{NO}^-$  pode resultar da ionização do nitroxil (HNO) (para revisão ver Buther *et al.*, 1995). Os RSNO têm sido identificados em eritrócitos, leucócitos polimorfonucleares, cérebro, plaquetas e plasma (Jia *et al.*, 1996; Giovannoni *et al.*, 1997; Gaston *et al.*, 1998; Gordge *et al.*, 1998; Do *et al.*, 1996). Atualmente acredita-se que a interação química do tiol-NO é relevante para a bioatividade neuronal, imune, anti-microbica e relaxamento do músculo liso. As concentrações teciduais de NO e RSNO encontram-se na ordem de nanomolar (Lancaster, 1994) e micromolar (Arnell & Stamler, 1995), respectivamente. As reservas de S-nitrosoglutathiona (GSNO), uma forma particular de RSNO, podem ser

favorecidas pela estabilidade, cinética e termodinâmica conferidas por outros RSNO (Stamler *et al.*, 1992b); reações de transnitrosilação com RSNO endógenos de baixo peso molecular (Singh *et al.*, 1996) e ainda, altas concentrações de glutatona reduzida em vários tecidos (Do *et al.*, 1996). A S-nitrosilação pode modificar a estrutura de proteínas por interação direta ou oxidação de tióis vicinais, sendo que ambas as vias de interação afetam a sinalização celular, contudo levam a diferentes efeitos biológicos. Um exemplo disto é a S-nitrosilação progressiva que ativa reversivelmente os canais de rianodina sensíveis à liberação de  $\text{Ca}^{+2}$ , enquanto oxidações de tióis vicinais nos mesmos canais causam ativação irreversível. A reação direta do NO com grupamentos tióis de proteínas ou canais iônicos tem sido investigada (Stamler *et al.*, 1992b), principalmente porque a base bioquímica desta interação pode levar ao conhecimento de alternativas sobre a sinalização do NO. Na musculatura lisa vascular, os canais de  $\text{K}^{+}$  dependentes de cálcio são exemplos de proteínas que podem ser funcionalmente modificadas por nitrosilação (Bolotina *et al.*, 1994) e encontram-se envolvidas na proliferação celular (Wonderlin & Strobl, 1996). Podemos também citar, como exemplos, os canais de cálcio do tipo L no músculo cardíaco (Campbell *et al.*, 1996), os canais de  $\text{Na}^{+}$  presentes em baroreceptores (Li *et al.*, 1998) e os receptores de glicocorticóides (Galigniana *et al.*, 1999). Além disso, espécies reativas de NO como o  $\text{NO}^{+}$  podem ativar diretamente proteínas G de baixo peso molecular ( $\text{p21}^{\text{ras}}$ , RAC 1 ou Cdc42) que levam a ativação de MAP-kinases. Estas espécies também ativam diretamente outros eventos de sinalização como as quinases ERK, JNK e p38 (para revisão ver Broillet, 1999).

### **Efeitos Indiretos**

O NO é um radical livre que, ao reagir com o ânion superóxido ou oxigênio molecular, forma outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (para revisão ver Wink & Mitchell, 1998), as quais favorecem o mecanismo pelo qual o NO exerce seus efeitos indiretos. A reação do NO com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) gera o ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ; Beckman *et al.*, 1990), cujo efeito biológico é o relaxamento da musculatura lisa vascular (para revisão ver Katayama, 1995). Além disso, o peroxinitrito é uma molécula instável que pode gerar espécies semelhantes ao radical hidroxil, importantes mediadores do estresse oxidativo em diversos estados patológicos (Dalloz *et al.*, 1997). Estudos com o peroxinitrito e doador de peroxinitrito, o SIN-1, mostraram que este composto causa danos em células endoteliais (Katayama, 1995). Os outros trabalhos demonstram que o peroxinitrito participa de processos inflamatórios, isquemia e/ou injúria tecidual por reperfusão (Muijsers *et al.*, 1997), no entanto parece que a atividade citotóxica contra microorganismos patógenos é sua principal ação biológica.

### **2.4. NO E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

A indução e a atividade da iNOS produz elevadas concentrações de NO, muito acima das encontradas na ausência da iNOS. No sistema imune, o NO é importante molécula efetora na atividade citotóxica e citostática de macrófagos contra patógenos e células tumorais (MacMicking *et al.*, 1997). O NO produzido por macrófagos inibe a proliferação de linfócitos T em infecções induzidas experimentalmente como a tripanosomíase murina e a infecção por micobactérias (Schiefer & Mansfield, 1993; Maw *et al.*, 1997).

O NO derivado do endotélio está envolvido na regulação da proliferação celular do músculo liso, evidenciado tanto pelo uso de doadores de NO como pela transferência do gene da eNOS *in vitro*. O NO também exerce efeito anti-proliferativo em fibroblastos, linfócitos e células mesangiais (Garg & Hassid, 1989; Garg & Hassid, 1990a; Denham & Rowland, 1992). Outros estudos *in vitro* mostram que o NO interfere em processos envolvidos na aterogênese, e que a diminuição da síntese de NO na disfunção endotelial pode ser um evento precoce nesta patologia (Bült, *et al.*, 1996). Além disso, estudos *in vivo* mostraram que a suplementação dietética com arginina, a aplicação de doadores de NO ou a transfecção do gene da eNOS na parede arterial reduziram a hiperplasia da camada íntima (Kojda & Novack, 1995; Von Der Leyen *et al.*, 1995). Alguns trabalhos mostram que o efeito anti-proliferativo do NO pode ser atribuído ao aumento do cGMP, seja pelo uso de análogos permeantes de cGMP (Garg & Hassid, 1989), de inibidores da hidrólise do cGMP (Yu *et al.*, 1997) ou de peptídeos natriuréticos que elevam o conteúdo intracelular de cGMP (Abell *et al.*, 1989). No entanto, o papel da sCG na inibição do crescimento celular causado pelo NO permanece não esclarecido. Em células endoteliais, os efeitos dos doadores de NO na proliferação podem variar entre a inibição (Yang *et al.*, 1994) e o aumento da proliferação (Arnal *et al.*, 1994). Não existe uma clara explicação para esta dualidade, embora possam ser relacionadas à origem do tecido, ao tipo celular utilizado, às variações das condições de cultura celular (Ziche *et al.*, 1994) e às diferenças nas concentrações de NO. Outros trabalhos demonstram que doadores de NO inibem a proliferação de linfócitos humanos por um mecanismo independente de cGMP (Karup *et al.*, 1994; Correia *et al.*, 1994; Kankaanranta *et al.*, 1996).

A progressão do ciclo celular é regulada por ativação periódica de uma família de proteoquinases dependentes da ciclina (Cdks), as quais induzem fosforilação de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. A associação de uma subunidade regulatória é necessária para ativação das Cdks, controlando sua habilidade de fosforilar alvos proteicos apropriados. Os complexos formados pelas proteínas Cdk2/ciclina E e Cdk2/ciclina A, são respectivamente importantes reguladores das fases G<sub>1</sub> e S do ciclo celular. Doadores de NO bloqueiam a expressão de ciclina A e a atividade da Cdk2 (Guo *et al.*, 1997), inibindo a proliferação de CML após a injúria causada por balão, em artéria carótida de rato.

### 3. CANAIS DE POTÁSSIO

#### 3.1. IMPORTÂNCIA

A membrana plasmática de células animais e vegetais possui canais altamente seletivos ao transporte iônico e que conectam o citosol ao exterior celular. Esses canais relacionam-se ao transporte de íons inorgânicos principalmente Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, sendo denominados de canais iônicos, cuja função principal é o controle do fluxo iônico que é essencial para várias funções celulares. Os canais iônicos mais comuns são aqueles permeáveis ao K<sup>+</sup>, os quais podem ser encontrados na membrana plasmática de quase todas as células animais, fundamentalmente mantendo o potencial de membrana. Este potencial ocorre quando existe diferença de carga elétrica entre os dois lados de uma membrana. Os canais de K<sup>+</sup> encontrados nas membranas plasmáticas, não estão distribuídos de forma aleatória na superfície celular. Alguns canais de K<sup>+</sup> possuem uma seqüência de aminoácidos que possibilita sua associação com proteínas de suporte estrutural

(*scaffolding proteins*), como as do domínio PDZ (domínios que estabelecem a união de proteínas citosólicas e transmembranares, mediando transduções de sinais mais complexas), resultando no agrupamento daqueles canais em regiões específicas. Nos neurônios, por exemplo, há uma co-localização de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e canais de  $\text{K}^{+}$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal pré-sináptico.

A análise da forma e da função dos canais de  $\text{K}^{+}$  é importante para o entendimento da fisiologia de células excitáveis, principalmente aquelas que fazem parte dos sistemas nervoso, cardiovascular e músculo-esquelético. Os canais de  $\text{K}^{+}$  são encontrados em diferentes tipos celulares exercendo diferentes efeitos biológicos. Um exemplo é a regulação do potencial de membrana do músculo liso vascular. O bloqueio destes canais despolariza a membrana, enquanto que sua ativação a hiperpolariza, inibindo a contração vascular, uma vez que ocorre redução da concentração intracelular de cálcio (Brayden, 1996; Okada *et al.*, 1993). Apenas como exemplos da diversidade de eventos fisiológicos nos quais estes canais estão envolvidos, podemos citar o papel dos canais de  $\text{K}^{+}$  na reabsorção e excreção de potássio pelo epitélio renal; na hiperpolarização das células T e B como pré-requisito à mitogênese e à proliferação na resposta imune; na transdução do sinal em células mecano-sensoriais; na regulação do fluxo osmótico das células estomáticas das plantas resultantes das variações dos níveis de gás e água, e na regulação do volume e manutenção da forma dos eritrócitos (para uma revisão ver Miller, 2000).

### 3.2. TIPOS

Em geral, a atividade dos canais de  $\text{K}^{+}$  é finamente regulada por controles tecido-específicos como a transcrição e ações bioquímicas que influenciam as

proteínas do canal. Alguns canais de  $K^+$  são constitutivamente ativos, mas a maior parte deles agem transitoriamente, sendo abertos por sinais fisiológicos como neurotransmissor ou segundo mensageiro. Canais de  $K^+$  dividem-se em canais de potássio dependente de voltagem ( $K_v$ ), canais de  $K^+$  retificadores de influxo (*inward rectifier*,  $K_{IR}$ ), canais de  $K^+$  ATP-dependentes ( $K_{ATP}$ ) e canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ). Os canais  $K_v$  são ativados por despolarizações. Alguns canais de  $K^+$  cálcio-dependentes são sensíveis aos níveis citoplasmáticos de  $Ca^{2+}$  e a voltagem, embora outros respondam somente ao  $Ca^{2+}$ . Diferentes canais de  $K^+$  retificadores de influxo de são diretamente abertos por fatores intracelulares como a proteína G, nucleotídeos ou poliaminas (Miller, 2000). Diferentes mecanismos estão envolvidos na modulação de canais de potássio por segundos mensageiros, mas eventos de fosforilação/defosforilação são os mais usuais (Catterall *et al.*, 1991).

A relação entre as propriedades elementares dos subtipos de canais de  $K^+$  e a atividade do NO sobre os mesmos são abordadas a seguir:

**a) Canais de  $K^+$  dependente de voltagem:** A atividade do canal  $K_v$  aumenta com a despolarização da membrana, sendo que este canal participa ativamente da fase de repolarização da membrana celular. Existem dois subgrupos: os canais de baixa condutância (condutância média de 7 pS) e os de média condutância (condutância média de 70 pS), sendo que a inibição destes canais é mediada por  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  intracelulares. Foram identificados canais  $K_v$  na musculatura lisa em diferentes artérias, como coronária, cerebral, renal, mesentéria e pulmonar. Compostos tais como a 4-aminopiridina (de forma muito seletiva), TEA ou  $Ba^{2+}$  bloqueiam a atividade dos  $K_v$  em vasos. O NO abre estes canais por mecanismos dependentes



e/ou independentes de cGMP, hiperpolarizando a membrana e resultando em vasorelaxamento (para uma revisão ver Brayden, 1996).

**b) Canais de  $K^+$  retificadores de influxo:** Os canais  $K_{IR}$  participam ativamente, durante a diminuição e o aumento do potencial de membrana celular da musculatura lisa arterial, produzindo influxo e efluxo de íons  $K^+$ , respectivamente. São denominados de canais anômalos e são inibidos por TEA ou  $Ba^{2+}$ . Estudos em artéria cerebral de coelho mostram que a indução de *shear stress* promove a ativação dos canais  $K_{IR}$  nas células endoteliais, levando-as a sintetizar e liberar o NO (Weliman *et al.*, 1995).

**c) Canais de  $K^+$  ATP-dependentes:** Os  $K_{ATP}$  são abertos quando ocorre uma diminuição nos níveis de ATP intracelular. O TEA, ou drogas mais seletivas como as sulfonilurêias, glibenclamida e tolbutamida têm efeito inibitório nestes canais. De forma inversa, alguns vasodilatadores endógenos como o CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*), o VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*) e a adenosina, e exógenos, como o pinacidil e o cromacalim causam a ativação dos  $K_{ATP}$  e hiperpolarização da membrana celular (para uma revisão ver Brayden, 1996).

**d) Canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ :** Existem três classes distintas de canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ , de acordo com sua condutância ao potássio. A primeira classe refere-se aos canais de alta condutância (abreviadamente  $BK_{Ca}$ ; condutância média de 250 pS). A segunda classe é constituída pelos canais de condutância intermediária ( $M/K_{Ca}$  ou  $IK_{Ca}$ ; condutância média 60 pS) e a terceira pelos canais de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ; condutância média da ordem de 15 pS). Os três tipos de canais dependem ainda da elevação da concentração intracelular de cálcio para sua abertura (Vergara *et al.*, 1998).

Os canais de alta condutância (também denominados de Maxi BK<sub>Ca</sub> ou *Big channels*) distribuem-se amplamente em diferentes tecidos (para uma revisão ver Brayden, 1996). Estes canais podem ser também ativados por proteínas quinases dependentes de cAMP ou cGMP e/ou diretamente pela proteína G (para uma revisão ver Brayden, 1996). Alguns trabalhos sugerem que o componente principal para a ativação do BK<sub>Ca</sub> seja via cGMP em células de músculo liso vascular (Fujino *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1993 e Taniguchi *et al.*, 1993). Este tipo de canal pode ser eficientemente bloqueado por toxinas animais (caribdotoxina, iberitoxina e apamina; Vergara *et al.*, 1998)

Os canais de baixa condutância também têm uma ampla distribuição. São menos estudados que os de alta condutância e podem ser inibidos pela tubocurarina (Khole *et al.*, 1996) de forma não-seletiva. Em relação ao bloqueio causado pela apamina, estes canais dividem-se naqueles sensíveis à apamina e os que não o são (Vergara *et al.*, 1998). Um exemplo da função destes canais está na observação de que o aumento da expressão destes canais em camundongos altera a função da musculatura lisa uterina comprometendo o parto (Bond *et al.*, 2000). Com base neste e em outros estudos, sugere-se que o melhor entendimento da função e da modulação destes canais possa permitir uma melhor avaliação do seu papel em desordens neurodegenerativas e de músculo liso (Shieh *et al.*, 2000).

Os canais de condutância intermediária também são encontrados em vários tipos celulares, como o fibroblasto e células de origem tumoral (Rane, 2000). Estes canais são bloqueados pela caribdotoxina, mas não pela iberitoxina ambas bloqueadoras de canais de alta condutância. Importante, a apamina não é capaz de bloquear este tipo de canal. Existem outros bloqueadores não-seletivos para este

tipo de canal, tais como clotrimazol (Brugnara *et al.*, 1995) e, mais recentemente, o TRAM-34, um inibidor mais seletivo (Wulff *et al.*, 2000).

### 3.3. CANAIS DE POTÁSSIO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os canais de potássio fazem parte de uma diversificada família de canais iônicos de membrana e estão implicados numa grande variedade de funções fisiológicas. As variações funcionais dos canais de  $K^+$  são importantes na fisiologia do crescimento e da proliferação de células cancerosas e normais. Uma variedade de subtipos de canais de  $K^+$  pode ser encontrada em diferentes sistemas biológicos, inclusive numa única célula (para uma revisão ver Latorre & Miller, 1983). Estes canais têm significativo papel sobre o controle da proliferação celular, porém nem todos eles contribuem necessariamente neste processo. São muitos os esforços para definir o mecanismo específico dos canais de  $K^+$  neste processo, mas isto ainda não está bem esclarecido, talvez pelas diferenças entre os vários tipos celulares estudados. Por exemplo, canais de potássio dependentes de voltagem atuam como ativador autócrino por influenciar na elaboração e secreção de interleucina-2 (IL-2), controlando a proliferação de linfócitos T (Chandy *et al.*, 1984). Os canais de potássio cálcio-dependentes estão envolvidos em mecanismos regulatórios no crescimento de linfócito B (Partiseti *et al.*, 1992).

A abertura ou ativação dos canais de  $K^+$  é necessária para passagem através de estágios específicos do ciclo celular, principalmente num estágio muito precoce da proliferação celular, servindo de elo entre vias de sinalização bioquímica e fisiológica que regulam a progressão do ciclo celular (Wonderlin & Strobl, 1996).

A função e regulação do crescimento celular associado aos canais devem ser diferentes daquelas onde o canal está envolvido na sinalização elétrica de células excitáveis, cuja modulação é realizada por receptores acoplados a proteínas G. Estudos com peptídeos mitogênicos mostraram a relação entre a atividade do  $K_{Ca}$  e a proliferação celular. Um exemplo disto é a *upregulation* de  $K_{Ca}$  em fibroblastos na presença de PDGF (mitógeno completo, isto é, não requer a presença de um co-mitógeno para estimular a proliferação de maneira eficiente), sustentada por 24 h. Por outro lado, a densidade destes canais volta ao nível pré-mitogênico depois de 6 h de tratamento com EGF (mitógeno parcial) (Huang & Rane, 1994).

## **OBJETIVOS**

Existe na literatura um grande número de trabalhos mostrando o efeito do NO em canais iônicos e em menor número, estudos mostrando a participação de canais na proliferação celular. Por outro lado, não há dados mostrando que o NO agindo em canais iônicos possa influenciar a proliferação celular. Sendo assim, nossos objetivos foram:

#### **GERAL**

- Investigar o efeito do óxido nítrico na proliferação celular.

#### **ESPECÍFICOS**

- Comparar o efeito de 3 doadores de NO (SNAP, GSNO e SNP) sobre a proliferação celular.
- Determinar as concentrações citostáticas e citotóxicas do NO nas linhagens celulares utilizadas neste estudo.
- Investigar a reversibilidade do efeito do NO sobre a proliferação celular.
- Investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito do NO sobre a proliferação celular no que se refere ao envolvimento da guanilato ciclase solúvel, do citoesqueleto e de canais de potássio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. LINHAGENS DE CÉLULAS

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de células de mastocitoma de camundongo, P815 e MCP-5. A primeira foi obtida comercialmente da ATCC (*American Type Culture Collection*) e a segunda foi inicialmente caracterizada por Naveen *et al.*, (1993) e nos foi gentilmente cedida pela Dra. Sandra Oliveira, USP/Ribeirão Preto. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, glutamina 2 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O repique das culturas foi realizado a cada 3-4 dias por remoção de 90% de meio contendo as células e adição de meio fresco até a passagem de número 8, no caso da linhagem P815.

Para a realização dos experimentos, as células foram obtidas por centrifugação (250 x g, 10 min), seguida de descarte do sobrenadante e resuspensão do precipitado em meio fresco, de onde foi retirada uma pequena alíquota para determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão de Azul de Trypan. Para tal, uma alíquota de 20 µl da suspensão celular foi diluída (1/10) em uma solução de Azul de Trypan (0,5%) e a proporção de células viáveis (que não apresentaram coloração azulada intracitoplasmática) foi avaliada em câmara de Neubauer e microscópio ótico comum (aumento de 400 vezes). Suspensões celulares com no mínimo 98% de viabilidade foram plaqueadas em triplicata (5 x 10<sup>4</sup> células em 200 µl de meio por poço) em placa de 96 poços estéril e os compostos ou veículos adicionados em volume máximo de 20 µl. As placas foram incubadas em



estufa (37°C) pelo período experimental adequado (4-48 h) e processadas para os ensaios específicos.

### 3.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA

Para investigação da proliferação celular, utilizamos o método descrito por Kueng *et al.* (1989) com algumas modificações. Ao final do período experimental, as células foram cuidadosamente resuspensas e transferidas para placas de 96 poços com fundo em V. As células de cada poço foram fixadas e coradas pela adição de 20 µl da solução de cristal violeta (composição descrita no item 3.8) e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante 30 min. A placa foi centrifugada (270 x g, 10 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas desta forma duas vezes com água deionizada para retirar o excesso de corante. Após a última centrifugação, as células foram resuspensas em 200 µl de solução de SDS (1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio em água deionizada), incubadas a temperatura ambiente por 15 min para lise das células e extração do corante. O conteúdo da placa foi transferido para placa de 96 poços de fundo plano e a densidade óptica determinada em leitor de placas Ultra Microplate Reader ELX808 (Biotek Instruments Inc., USA) à 550 nm. Para validar a correspondência entre a densidade ótica e número de células, experimentos paralelos foram realizados nos quais o número de células foi contado em câmara de Neubauer.

### 3.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular, foi utilizado como metodologia o ensaio do MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio] descrito por Van de Loosdrecht *et al.* (1991). O princípio deste método reside no fato de que este corante é oxidado por espécies ativas de oxigênio vindas da atividade mitocondrial, portanto uma medida indireta da viabilidade celular. O sal de MTT-formazan que se forma é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Consequentemente, a coloração obtida nos grupos controle representa 100% de viabilidade celular. Resumidamente, as células foram centrifugadas ao final de cada período experimental para remoção do sobrenadante, uma vez que o NO liberado no meio tem a capacidade de oxidar o MTT e isto interfere nos resultados. A seguir, adicionou-se 100 µl de meio de cultura contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/ml em PBS) em cada poço. Em seguida as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 h. Após este período, as células foram centrifugadas para remoção do sobrenadante e adição de 100 µl de álcool isopropílico/HCl 0,04 N em cada poço, seguida de repouso por 10 min. Nova centrifugação foi feita para retirada dos debris celulares e obtenção de um sobrenadante límpido para leitura da densidade ótica em leitor de placa à 550 nm. Experimentos preliminares da determinação da viabilidade celular por Azul de Trypan ou por MTT forneceram resultados similares. Assim sendo e por uma questão de conveniência e custo, passamos a utilizar regularmente a técnica do Azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular.

### 3.4. ÍNDICE MITÓTICO

Uma alíquota contendo  $5 \times 10^4$  células foi destinada à confecção de lâminas por citocentrifugação que, após a secagem foram coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A análise morfológica foi feita em microscopia ótica comum com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 800 x). O índice mitótico foi expresso como porcentagem de células em mitose/total de células contadas, após contagem de 100 células por lâmina.

### 3.5. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR DOADORES DE NO

Levando-se em consideração que o NO decai a concentrações aproximadamente idênticas de nitrato e nitrito em cultura (Hibbs *et al.*, 1990), determinamos a concentração de nitrito pela reação de Griess para obter a taxa de liberação de NO pelo doador utilizado (SNAP). As células ( $5 \times 10^4$ /poço em 200 µl de meio) foram incubadas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> com SNAP (100 µM) durante períodos de 30 min, 1, 2, 3 e 4 h. Outro grupo de células foi incubado sem SNAP, enquanto dois outros grupos continham apenas meio de cultura, com ou sem SNAP. Após cada tempo experimental, retirou-se 100 µl do sobrenadante de cada grupo para misturar com o mesmo volume de reagente de Griess em placa de 96 poços para posterior leitura em leitor de placa à 550 nm. Uma curva-padrão de nitrito (0 a 150 µM) foi realizada simultaneamente e os valores foram expressos em µM.

### 3.6. COMPOSTOS E MEIO DE CULTURA

Para este estudo utilizou-se meio de cultura, soro e antibióticos (GIBCO, São Paulo, Brasil); SNAP (S-nitroso-N-acetil-D,L-penicillamina) e GSNO (S-

nitrosoglutathiona) sintetizados em nosso laboratório pelo método de Field *et al.* (1978) e Rockett *et al.* (1991), respectivamente; SIN-1 ([3-(4-morpholinyl)-sydnimine-hydrochloride]) gentilmente cedido pelo Dr. K. Schonafinger, (Hoechst, Alemanha); ODQ (1H-(1,2,4)-oxadiazol-(4,3-a)-quinoxalin-1-one) gentilmente cedido pelo Dr. Fernando Cunha, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Tetraetilamônio, 4-aminopiridina, glibenclamida, colchicina, citocalasina B, dibutilil monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) forma adquiridos da Sigma Chemical Co., USA; caribdotoxina, iberiotoxina e apamina foram adquiridos de Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). Todas os compostos foram diluídos para o uso em meio de cultura, exceto a glibenclamida que foi preparada em DMSO e as toxinas que foram preparadas em PBS contendo albumina sérica bovina livre de proteases (5 mg/ml). Os demais reagentes foram obtidos de fontes comerciais e da melhor qualidade possível.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de triplicatas. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes com resultados similares ( $n$  total de 6 a 9). Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni. Um valor de  $P$  menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

### 3.8. SOLUÇÕES

#### 3.8.1. - Cristal Violeta

Cristal Violeta ..... 100 mg  
Etanol p.a. .... 30 ml  
Formaldeído p.a. (solução estoque 40% ) ..... 50 ml  
Sais adicionados para fornecer concentrações finais (em mM) NaCl (137), KCl (2,7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5) e  $\text{NaHPO}_4$  (8,1)  
Água deionizada qsp ..... 100 ml  
pH ajustado para 7,0.  
Estocada em geladeira por prazo Indefinido.

#### 3.8.2. - Reagente de Griess

Solução 1: sulfanilamida 1% (p/v) em ácido fosfórico 10% (v/v).

Solução 2: alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% (p/v) em água Milli-Q.

As duas soluções são armazenadas em geladeira por até 2 meses. Na hora de uso, são misturadas em partes iguais para formar o reagente de Griess, que é misturado em partes iguais com a amostra em questão.

#### 3.8.3. - Reagentes para ensaio do MTT

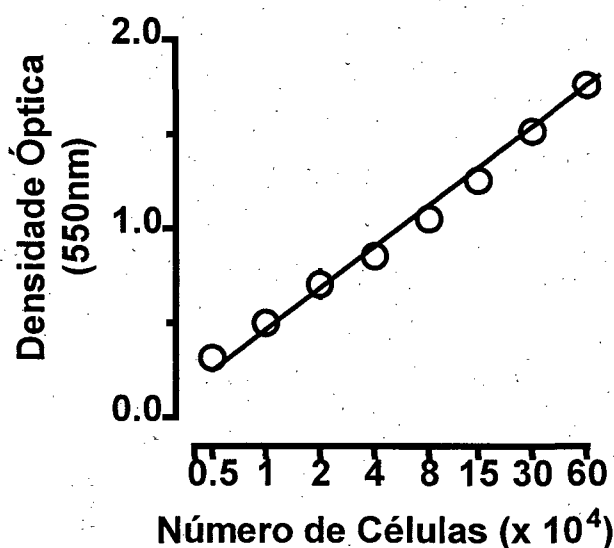
Solução 1: 5 mg [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio] em 1 ml PBS

Solução 2: álcool isopropílico/HCl 0,04 N

## RESULTADOS

#### 4.1. VALIDAÇÃO DA MEDIDA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA

Como pode ser visto na Figura 1, existe uma correlação linear entre o número de células avaliado pelo método do cristal violeta e a contagem direta em câmara de Neubauer. Assim, diante do grande número de amostras analisadas durante os experimentos, o método do cristal violeta foi utilizado no restante deste trabalho para avaliar o número de células, já que ele é de fácil performance, mais barato e mais adequado do que a contagem direta em câmara.

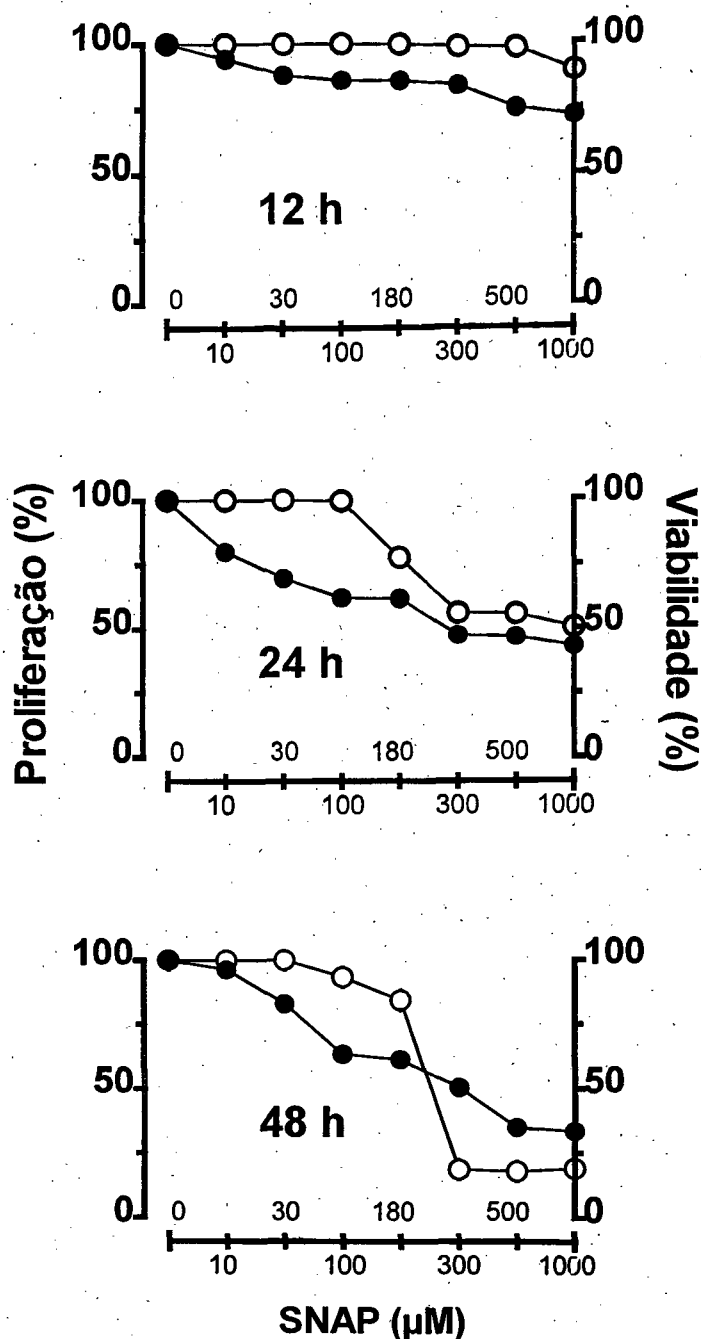


**Figura 1 – Validação do método de coloração com cristal violeta em comparação com a contagem direta em câmara de Neubauer.** Vários grupos formados por diferentes números de células viáveis (viabilidade determinada por Azul de Trypan e contagem direta em câmara de Neubauer) foram semeados em placas de 96 poços (em triplicata) em 200 µl de meio de cultura. Cada grupo foi fixado e corado com solução de cristal violeta, lavado com água deionizada, homogeneizado em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS, 1% p/v) e a leitura da densidade óptica realizada em 550 nm, conforme descrito em Métodos. Cada ponto representa a média ± EPM de triplicatas. Quando a barra de erro não for visível, ela está encoberta pelo símbolo. O coeficiente de correlação foi de 0,886.

#### 4.2. EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

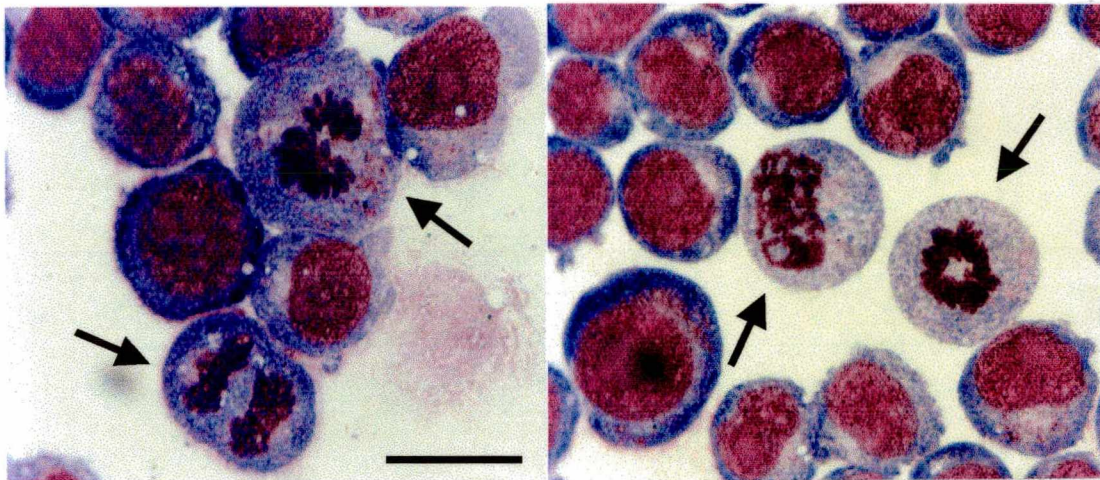
Estudos mostram que o óxido nítrico pode ser citostático (Peunova & Enikolopov, 1995) ou citotóxico (Albina & Reichner, 1998) dependendo da concentração de doador de NO e da linhagem celular utilizada. Com o objetivo de se estudar o efeito citostático do NO, eliminando a possibilidade de que a citostase pudesse estar ocorrendo por causa de um efeito citotóxico, realizamos o seguinte experimento. Células da linhagem P815 foram incubadas com várias concentrações de SNAP (a saber 10, 30, 100, 180, 300, 550 e 1000  $\mu\text{M}$ ) por diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 h). O resultado de tais experimentos está na Figura 2. Observa-se que a morte celular foi evidente somente em concentrações de SNAP acima de 180  $\mu\text{M}$  à partir de 24 h. Por outro lado, observa-se um nítido efeito citostático na faixa de concentrações até 100  $\mu\text{M}$ , onde todas as células permaneceram viáveis. Portanto, nesta faixa de concentração vê-se o efeito anti-proliferativo sem que isso possa ser atribuído a um efeito citotóxico e por esta razão esta faixa de concentração de SNAP (10 -100  $\mu\text{M}$ ) foi escolhida para ser usada no restante do nosso trabalho.





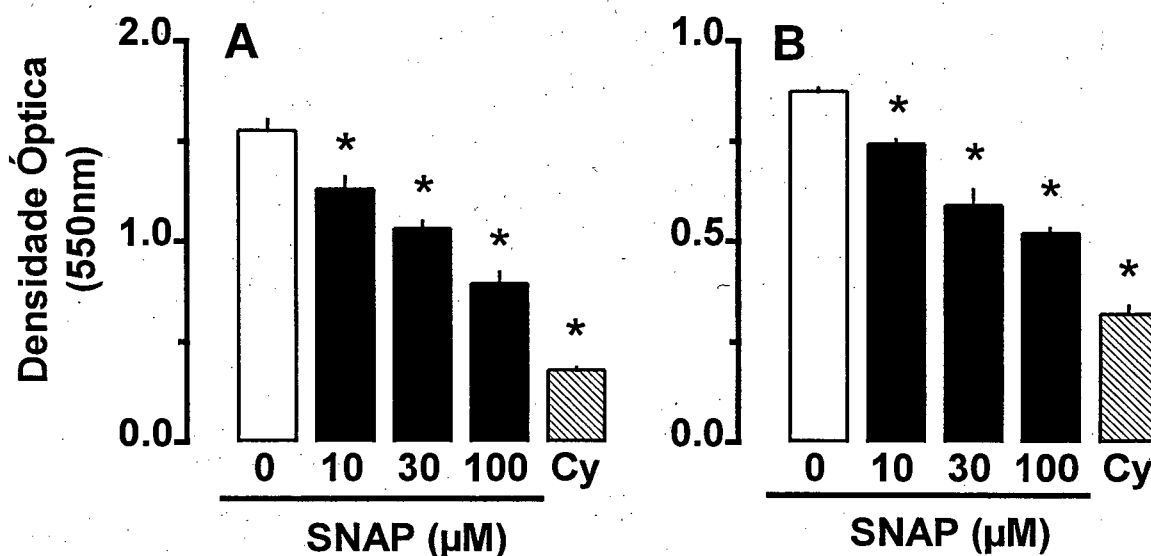
**Figura 2 – Efeito do óxido nítrico na proliferação e na viabilidade da linhagem celular P815 (mastocitoma de camundongo).** Células P815 foram plaqueadas em triplicata ( $5 \times 10^4$  células em 200  $\mu$ l de meio por poço) e incubadas com SNAP nas concentrações de 10, 30, 100, 180, 300, 550 e 1000  $\mu$ M nos períodos de tempo indicados. Ao final de cada experimento, foram avaliadas proliferação celular (círculos fechados) pelo método do cristal violeta e viabilidade celular (círculos abertos) pelo método do MTT. Cada ponto representa a média de triplicatas  $\pm$  EPM. Quando a barra de erro não for visível, ela está encoberta pelo símbolo.

Uma vez mostrado qual a faixa de concentrações de NO que causavam citostase, avaliamos a morfologia das células para verificar qual a razão da redução na proliferação. A Figura 3 mostra a interrupção da proliferação celular resultante do efeito do NO. A quantificação deste experimento mostra que existe um número muito maior de figuras mitóticas (com predomínio de metáfase) nas células tratadas com SNAP ( $0,7\% \pm 0,3\%$  e  $19 \pm 0,3\%$ , grupos controle e tratado com  $100 \mu\text{M}$  de SNAP, respectivamente; média  $\pm$  SEM de ensaios em triplicata,  $P < 0,05$ ).



**Figura 3 – Fotografia de células P815 após tratamento com SNAP.** Células da linhagem P815 foram incubadas com SNAP ( $100 \mu\text{M}$ , 24 h). Lâminas preparadas em citocentrífuga foram coradas com May Grünwald-Giemsa e examinadas em objetiva de imersão. A barra representa  $20 \mu\text{m}$  (aumento 1000 x) e as setas identificam as células em mitose.

A próxima série de experimentos visou avaliar se este efeito citostático do NO não era específico à linhagem P815. Para tanto, utilizamos outra linhagem de mastocitoma de camundongo, a MCP-5. Pode-se constatar que o SNAP nas concentrações de 10 a 100  $\mu\text{M}$  também exerce um efeito anti-proliferativo nesta linhagem, como mostrado na Figura 4, em comparação à linhagem P815. Portanto o efeito do NO não é específico para a linhagem celular P815.



**Figura 4 – Efeito do SNAP na proliferação das linhagens de mastocitoma de camundongo P815 e MCP-5.** As células das linhagens P815 (Painel A) e MCP-5 (Painel B) foram plaqueadas em triplicata ( $5 \times 10^4$  células em 200  $\mu\text{l}$  de meio por poço), incubadas (24 h) com SNAP nas concentrações indicadas ou com cicloheximida (Cy; 18  $\mu\text{M}$ ). A barra aberta indica células incubadas com meio de cultura somente ou apenas com meio de cultura. Após o período de incubação, o número de células foi avaliado pelo método do cristal violeta (ver legenda da Figura 1 e seção Material e Métodos). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de triplicatas. \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (barras abertas; ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

Diferentemente do SNAP, o NAP (composto não-nitrosilado do qual sintetiza-se o SNAP) e o GSH (precursor do GSNO) foram destituídos de qualquer efeito na proliferação celular (Tabela 2).

**Tabela 2-** Efeito dos compostos não-nitrosilados N-acetil-penicilamina (NAP) e glutathiona reduzida (GSH) e do doador de peroxinitrito (3-morfolinil sidnonimina; SIN-1) na proliferação da linhagem P815.

Compostos (µM)	Densidade Óptica (550 nm)
Controle	0,61 ± 0,03
SNAP 10	0,46 ± 0,03 <sup>a</sup>
100	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>
NAP 10	0,64 ± 0,05
100	0,59 ± 0,02
GSH 10	0,57 ± 0,03
100	0,72 ± 0,02
SIN-1 10	0,31 ± 0,02 #
100	0,30 ± 0,07 #

Células P815 foram plaqueadas, incubadas com compostos por 24 h, fixadas e coradas com solução de cristal violeta, como descrito na seção de “Material e Métodos”. Os dados representam a média das triplicatas ± EPM. <sup>a</sup> P < 0,05 *versus* grupo controle; # indica viabilidade celular reduzida em aproximadamente 40%, analisada pelo método de exclusão de Azul de Trypan.

**4.3. ESTUDO COMPARATIVO DA INFLUÊNCIA DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM P815**

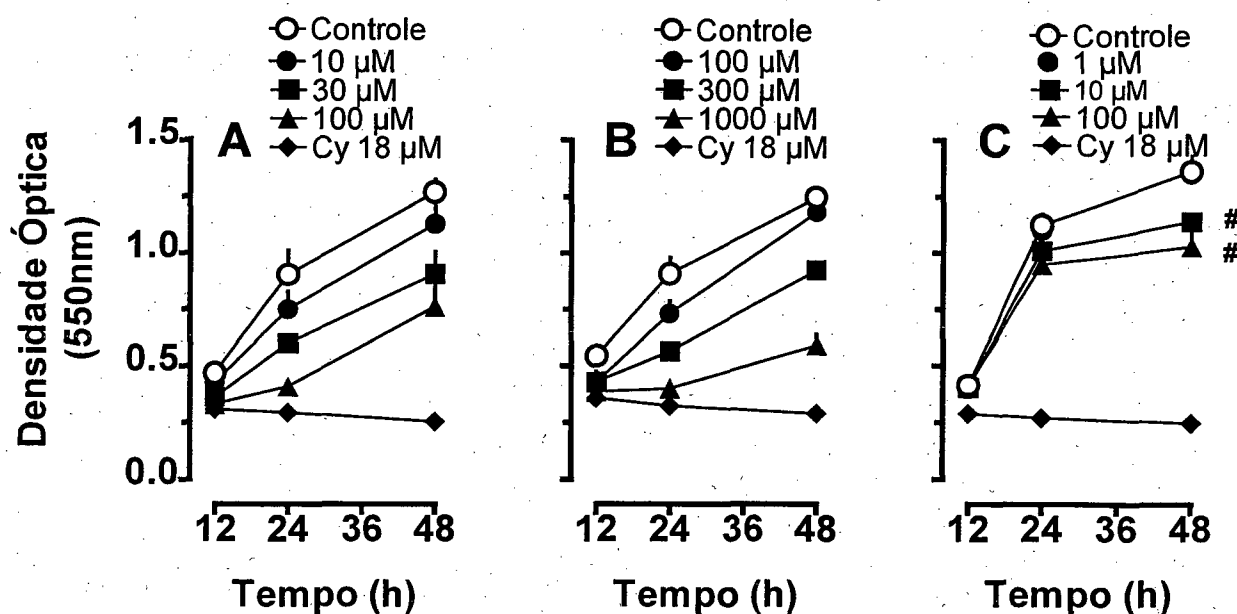
É bem conhecido que o NO pode ter efeitos opostos dependendo da sua concentração (McAndrew *et al.*, 1997). Assim sendo, o próximo bloco de experimentos visou a comparação do efeito anti-proliferativo de três doadores de NO. A diferença básica entre os três compostos reside na diferente cinética com que eles liberam o NO, quando em solução. Como mostrado na Figura 5, Painel A, o

SNAP (considerado um doador de cinética intermediária, com  $t_{1/2}$  da ordem de 1-3 h; Arnelle & Stamler, 1995) inibiu de maneira concentração- e tempo-dependente a proliferação celular da linhagem P815, com efeito inibitório máximo em torno de 50%, após o tratamento das células com SNAP na concentração de 100  $\mu$ M por um período de 48 h.

Um efeito similar foi observado com o GSNO (um doador de cinética lenta de  $t_{1/2}$  3 h; Arnelle & Stamler, 1995), sendo que o efeito máximo foi da ordem de 50% de inibição com a concentração de 1000  $\mu$ M (Figura 5, Painel B). Como para o SNAP, o efeito pode ser inteiramente atribuído ao NO já que os compostos não-nitrosilados (NAP e GSH, respectivamente) foram destituídos de efeitos anti-proliferativos (Tabela 2).

Já o nitroprussiato de sódio (Figura 5, Painel C) pareceu inibir acentuadamente a proliferação das células P815 mas, na verdade, causou morte acentuada (em torno de 40%), o que impediu a sua avaliação como inibidor da proliferação celular.

É importante ressaltar que, em todos os experimentos, a cicloheximida (um inibidor da síntese proteica) foi utilizada como controle positivo. Entretanto, nestas concentrações e nestes tempos de estudo (até 24 h) este composto não induziu morte celular, avaliada tanto pelo ensaio do MTT como do Azul de Trypan.



**Figura 5 – Comparação do efeito de SNAP, GSNO e SNP na proliferação de células P815.** As células foram plaqueadas em triplicata ( $5 \times 10^4$  células em 200 µl de meio por poço), incubadas com SNAP (Painel A), GSNO (Painel B) ou SNP (Painel C) nas concentrações e tempos indicados ou com cicloheximida (Cy; 18 µM); ou apenas com meio de cultura (símbolos abertos). Após o período de incubação, o número de células foi avaliado pelo método do cristal violeta (ver legenda da Figura 1 e seção Material e Métodos). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de triplicatas. As curvas representadas com símbolos quadrados (tempos 24 e 48 h, Painéis A e B), com triângulos (tempos 24 e 48 h, Painéis A e B) e com losangos (tempos de 24 e 48 h, Painéis A, B e C) foram estatisticamente diferentes dos respectivos tempos na curva controle (representada pelos símbolos abertos) (ANOVA seguido de teste *t* modificado por Bonferroni). # viabilidade celular reduzida em aproximadamente 40%, analisada pelo método de exclusão de Azul de Trypan.

#### **4.4. EFEITO DO PEROXINITRITO NA PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM P815**

É descrito na literatura que o peroxinitrito é citotóxico para vários tipos celulares (Beckman & Koopenol, 1996). Assim, resolvemos investigar se o efeito do NO descrito em nosso trabalho não seria decorrente da ação do peroxinitrito. Para isso, as células foram incubadas com um doador de peroxinitrito, o SIN-1, nas concentrações de 10 e 100 pM durante 24 h. A avaliação precisa do efeito anti-proliferativo do SIN-1 não pôde ser feita já que este composto induziu citotoxicidade da ordem de 40% (Tabela 2).

#### **4.5. PARTICIPAÇÃO DA VIA DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL NO EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Vários efeitos do NO são mediados pela ativação da enzima guanilato ciclase (sGC) e conseqüente produção de cGMP (Ignarro, 1991). Como existem estudos mostrando que o NO inibe a proliferação celular por um mecanismo mediado por cGMP (Garg & Hassid, 1989), avaliamos a possível participação do cGMP no efeito anti-proliferativo do NO. Para isto, foram utilizados o ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel, o 8-Br-cGMP, um análogo de cGMP permeante de membranas. De acordo com os dados mostrados na Tabela 3, a inibição da guanilato ciclase pelo ODQ não reverteu o efeito anti-proliferativo induzido pelo NO. Da mesma forma, o 8-Br-cGMP, não causou mudança na proliferação celular. É importante ressaltar que nem o ODQ nem o 8-Br-cGMP tiveram qualquer efeito sobre a proliferação das células P815 quando utilizados na ausência de NO.

**Tabela 3** – Efeito da inibição da guanilato ciclase por ODQ na diminuição da proliferação da linhagem P815 induzida por SNAP.

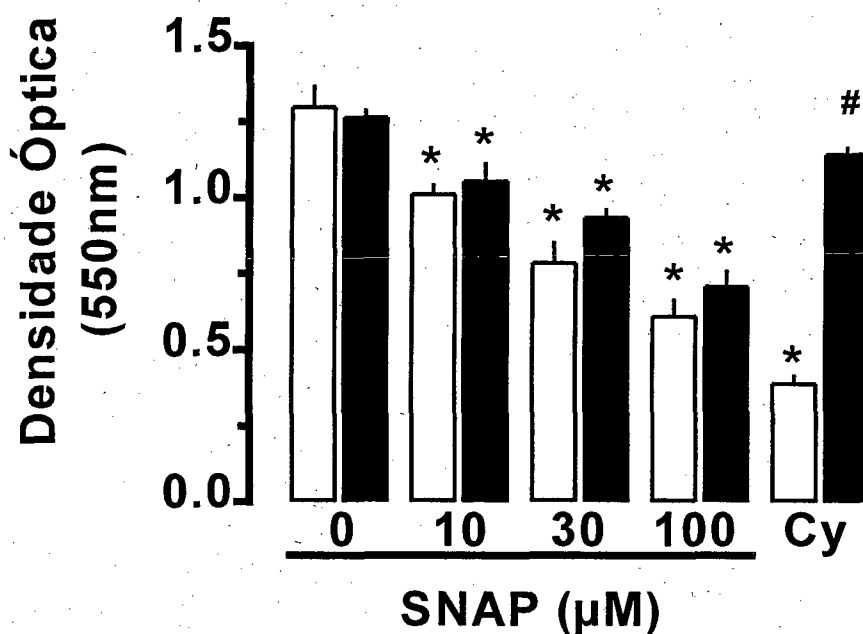
Compostos ( $\mu\text{M}$ )	Densidade Óptica (550 nm)
Controle	$1,21 \pm 0,04$
SNAP 100	$0,76 \pm 0,02^a$
ODQ 1	$1,21 \pm 0,04$
10	$1,11 \pm 0,01$
SNAP 100 + ODQ 1	$0,71 \pm 0,03^a$
SNAP 100 + ODQ 10	$0,81 \pm 0,05^a$

Células P815 foram plaqueadas, incubadas como compostos por 24 h, fixadas e coradas com cristal violeta, como descrito na seção de “Material e Métodos”. Os dados representam a média das triplicatas  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>  $P < 0,05$  *versus* controle.

#### 4.6. REVERSIBILIDADE DO EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO

Nosso próximo passo foi investigar a reversibilidade do efeito do NO sobre a proliferação celular. Para tal, um grupo de células foi incubado com SNAP por 4 h, lavadas para remoção do doador de NO e deixadas em meio apenas por mais 20 h. Nas mesmas condições experimentais, outro grupo de células foi incubado por 24 h sem a retirada do SNAP do meio. Como mostra a Figura 6, a exposição das células ao SNAP por apenas 4 h já foi suficiente para causar um efeito inibitório equivalente àquele visto quando o doador foi deixado por 24 h em contato contínuo com as células. É importante ressaltar que esta irreversibilidade não é generalizada já que a cicloheximida não compartilhou esta característica do SNAP.



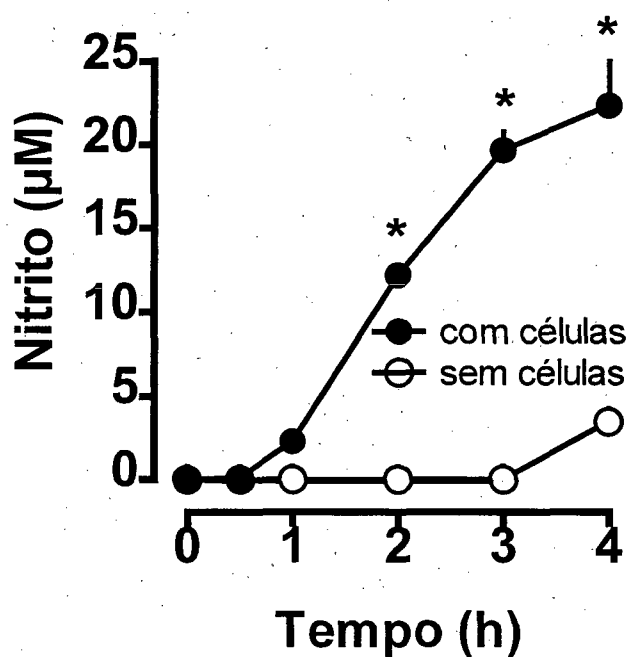


**Figura 6 - Irreversibilidade do efeito anti-proliferativo do óxido nítrico em células P815.** As células foram plaqueadas em triplicata ( $5 \times 10^4$  células em 200  $\mu$ l de meio por poço), incubadas com SNAP nas concentrações indicadas ou com cicloheximida (Cy; 18  $\mu$ M) por 4 h (barras fechadas) seguidas de lavagem e incubadas por mais 20 h sem o agente, ou por 24 h continuamente (barras abertas). Após o período de incubação, o número de células foi avaliado pelo método do cristal violeta (ver legenda da Figura 1 e na seção Material e Métodos). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de triplicatas. \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni). #  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo tratado com cicloheximida por 24 h.

Neste ponto, pareceu-nos importante avaliar qual a cinética de liberação de NO pelo SNAP para verificação se todo o doador teria se consumido em 4 horas. A Figura 7 mostra que em 4 hs, cerca de metade da concentração original do SNAP (assumindo que em condições de cultura o NO decai à concentrações aproximadamente iguais de nitrito e nitrato) ainda estava presente no meio de incubação. Um achado curioso neste experimento foi que a liberação de NO do SNAP é muito acelerada (cerca de 8-10 vezes em 4 h) pela presença de células.

#### **4.7. ENVOLVIMENTO DO CITOESQUELETO NO EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Vários estudos apontam o citoesqueleto como uma das estruturas essenciais para a proliferação celular (Sorger *et al.*, 1997). Sabendo que o NO é capaz de interferir com o funcionamento do citoesqueleto (Eiserich *et al.*, 1999), decidimos avaliar se isto poderia explicar o efeito anti-proliferativo do NO. Para tanto, foram utilizados como ferramentas farmacológicas a colchicina, um agente despolimerizante de microtúbulos, e a citocalasina B, um agente despolimerizante de microfilamentos. As células foram incubadas previamente com cada agente durante 30 min, seguido da adição e de co-incubação com SNAP até completar 4 h. As células foram então lavadas e deixadas em repouso por 20 h. Os resultados destes experimentos são apresentados na Tabela 4. É importante enfatizar que tanto a colchicina quanto a citocalasina quando incubadas com as células por 24 h (resultados não mostrados) inibiram completamente a proliferação celular.



**Figura 7 – Cinética de liberação de óxido nítrico por SNAP na presença ou ausência de células P815.** SNAP (100  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado a poços de uma placa de 96 poços, em triplicata, na ausência (círculos abertos) e na presença (círculos fechados) de células P815 ( $5 \times 10^4$  células/poço) e incubado à 37°C. Em diferentes períodos (30 min, 1, 2, 3 e 4 h), alíquotas do sobrenadante dos poços foram tomados, misturados com o mesmo volume do reagente de Griess e lidas em 540 nm. Os valores estão expressos como  $\mu\text{M}$  de nitrito e representam a média  $\pm$  EPM de triplicatas. \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo sem células (símbolos abertos).

**Tabela 4- Efeito da citocalasina B e colchicina na diminuição da proliferação da linhagem P815 induzida por SNAP.**

Compostos ( $\mu\text{M}$ )	Densidade Óptica (550 nm)
Controle	$0,87 \pm 0,03$
SNAP 100	$0,53 \pm 0,01^a$
Citocalasina B 1	$1,00 \pm 0,07$
Citocalasina B 10	$0,86 \pm 0,00$
SNAP 100 + Citocalasina B 1	$0,54 \pm 0,06^a$
SNAP 100 + Citocalasina B 10	$0,46 \pm 0,04^a$
Colchicina 1	$0,85 \pm 0,01$
Colchicina 10	$0,72 \pm 0,04$
SNAP 100 + Colchicina 1	$0,56 \pm 0,02^a$
SNAP 100 + Colchicina 10	$0,55 \pm 0,01^a$

Células P815 foram plaqueadas, incubadas como compostos por 4 h com ou sem SNAP, lavadas, resuspensas em meio, incubadas novamente por 20 h, fixadas e coradas com cristal violeta, como descrito na seção de "Material e Métodos". Os dados representam a média das triplicatas  $\pm$  EPM. <sup>a</sup>  $P < 0,05$  versus controle.

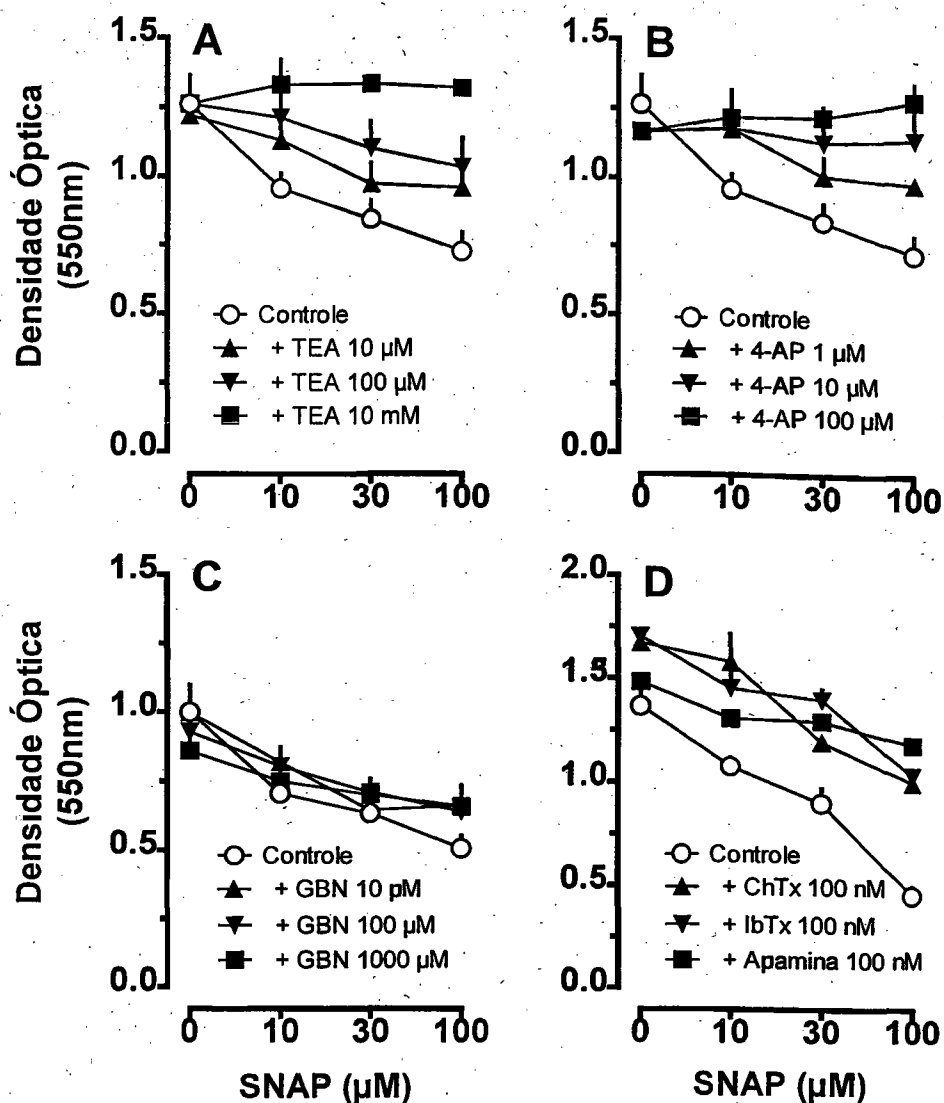
#### 4.8. ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO ANTI-PROLIFERATIVO DO ÓXIDO NÍTRICO

Os canais de potássio têm sido descritos como elementos importantes na proliferação celular (Wonderlin & Strobl, 1996). Assim, nossos próximos experimentos foram desenhados para investigar o envolvimento de canais de potássio no efeito anti-proliferativo do NO. O tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não-seletivo de canais de potássio reverteu de forma concentração-dependente a inibição da proliferação celular induzida pelo NO (Figura 8, Painel A). A 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador de canais de potássio sensíveis à voltagem teve um efeito similar ao TEA em causar uma reversão da inibição da proliferação induzida pelo NO (Figura 8, Painel B). Por outro lado, a glibenclamida um bloqueador de canais de potássio ATP-dependentes, não alterou a inibição da proliferação induzida pelo NO (Figura 8, Painel C). O uso de caribdotoxina, iberiotoxina e apamina, todas toxinas bastante seletivas para inibir os vários subtipos dos canais de potássio dependentes de cálcio, reverteu acentuadamente o efeito anti-proliferativo do NO (Figura 8, Painel D).

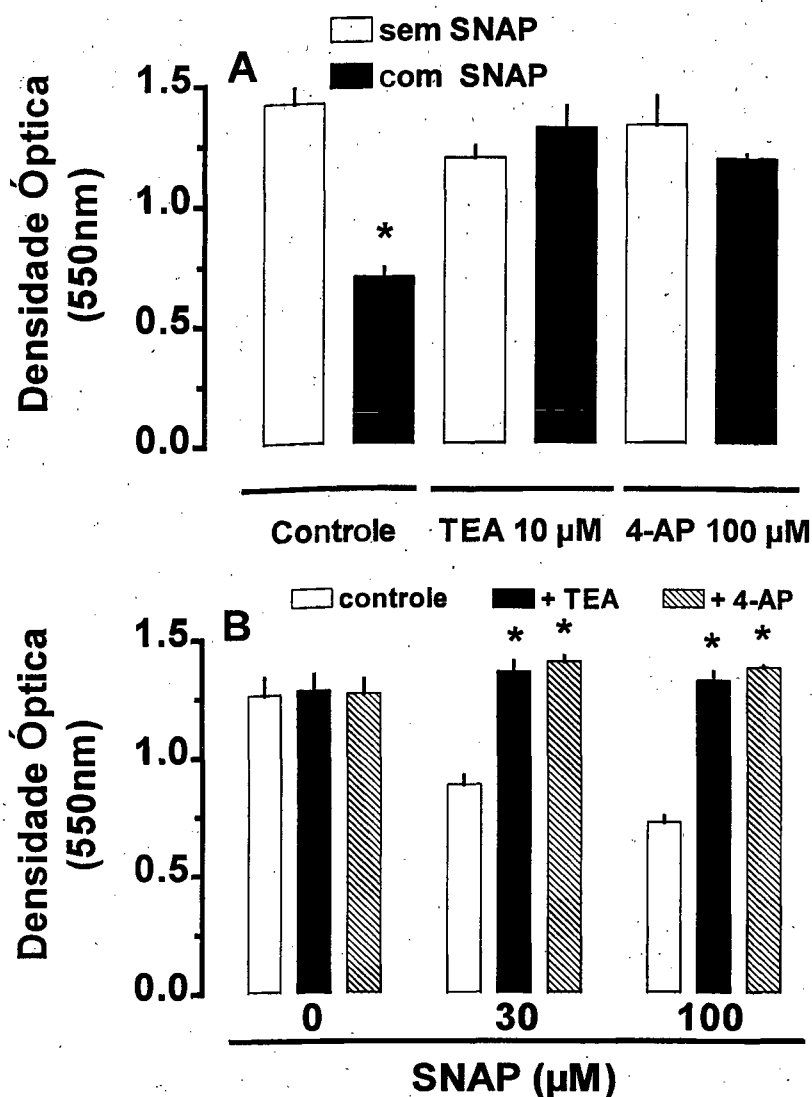
Tendo-se em conta que o efeito do NO é irreversível e que canais de potássio participam do efeito anti-proliferativo do NO, decidimos investigar se estes canais participariam apenas no início do processo de inibição da proliferação causada pelo NO ou se sua participação ocorre por tempos mais prolongados após a deflagração do processo pelo NO.

Para tanto fizemos dois experimentos. No primeiro deles, um grupo de células foi incubado com SNAP e TEA e outro com SNAP e 4-AP por 4 h. Após este tempo, as células foram lavadas para remoção dos compostos e deixadas na estufa por

mais 20 h, findas as quais a proliferação foi avaliada. Como mostra a Figura 9 , Painel A, tanto o TEA como a 4-AP bloquearam, de modo concentração-dependente, o efeito anti-proliferativo do NO. Assim, os canais de potássio parecem ser ativados pelo NO tão logo ele seja adicionado à cultura. No segundo experimento (Figura 9B), células foram incubadas com SNAP por 4 h, seguido de lavagem para remoção do doador. As células foram então incubadas por mais 4 h à 37°C e após este tempo (portanto 8 h após o início do experimento), foram adicionados TEA ou 4-AP. As células foram então deixadas na incubadora por mais 16 h findas as quais a proliferação foi avaliada. Observa-se que o efeito do NO também foi revertido pelos bloqueadores de canais de potássio nesta situação, indicando que estes canais continuam ativados mesmo depois de horas da retirada física do NO do meio, perpetuando assim a atividade anti-proliferativa do NO.



**Figura 8 - Efeito de bloqueadores de subtipos de canais de potássio na inibição da proliferação da linhagem P815 induzida por óxido nítrico.** As células foram plaqueadas em triplicata ( $5 \times 10^4$  células em 200  $\mu$ l de meio por poço), incubadas com SNAP nas concentrações indicadas na ausência (círculos abertos) ou na presença de TEA (tetrametilamônio; Painel A), 4-AP (4-aminopiridina), glibenclamida (Painel C) e com toxinas (Painel D; caribdotoxina, ChTx; iberiotoxina, IbTx e apamina) por 24 h. Após o período de incubação, o número de células foi avaliado pelo método do cristal violeta (ver legenda da Figura 1 e na seção Material e Métodos). Nenhum dos bloqueadores de canais de potássio causou efeito na proliferação celular na ausência de NO. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de triplicatas. As curvas representadas pelos símbolos fechados (exceto no Painel C) são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) das respectivas curvas controles (círculos abertos) quando avaliadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni.



**Figura 9 – Influência de bloqueadores de canais de potássio sobre o efeito anti-proliferativo do NO.** Células P815 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas, incubadas em 200 µl de meio com diferentes compostos, lavadas com DMEM e a leitura foi realizada em 24 h como descrito na Figura 1 e seção de Material e Métodos. Na Figura 9A, TEA (10 µM) e 4-AP (100 µM) foram incubados com ou sem SNAP (100 µM) por 4 h, após o que as células foram lavadas para remoção de todos os compostos. Na Figura 9B, as células foram incubadas com SNAP (30 e 100 µM) por 4 h, lavadas e deixadas na estufa por mais 4 h. Em seguida (8 h após o início do experimento), foram adicionados os bloqueadores de canais de potássio (TEA 10 µM, barras fechadas e 4-AP 100 µM, barras hachuradas), seguido de incubação por mais 16 h. Ao término deste tempo o número de células foi avaliado pelo método do cristal violeta (ver legenda da Figura 1 e na seção Material e Métodos). As barras representam a média das triplicatas  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$ , estatisticamente diferentes quando comparado ao controle respectivo (ANOVA seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

## DISCUSSÃO



O NO exerce diversos efeitos em processos fisiológicos, destacando-se aqueles pertinentes à neurotransmissão e à regulação do tônus vascular. O NO também é descrito como sendo um agente citostático e/ou citotóxico para vários tipos celulares. Neste sentido, o NO tem efeito anti-mitogênico em fibroblastos (Garg & Hassid, 1990) e pró-apoptótico na linhagem P815, um mastocitoma murino (Albina & Reichner, 1998). Especificamente em relação ao efeito anti-proliferativo, foi mostrado que macrófagos ativados e produzindo grandes quantidades de NO inibem a proliferação celular de linfócitos induzida por aloantígeno e lectina (Albina *et al.*, 1991). Entretanto, pequenas concentrações de NO, tais como as resultantes da produção de NO pelo endotélio, também podem exercer efeitos anti-proliferativos. Neste contexto, o NO produzido pelo endotélio vascular é de fundamental importância para regular o tônus da musculatura lisa vascular e, não menos importante, de inibir a proliferação das células musculares lisas vasculares (Moncada *et al.*, 1991; Garg & Hassid, 1993). Comprovação disto está no relato de que a transferência do gene da eNOS para o músculo liso da artéria carótida de rato desnudada de endotélio resultou no aumento da reatividade vascular e na redução da formação de neointima (Von der Leyen *et al.*, 1995). Assim, não restam dúvidas acerca do envolvimento do NO na regulação da proliferação celular.

Com o intuito de investigar mais detalhadamente o efeito do NO na proliferação celular, utilizamos uma linhagem celular de mastocitoma de camundongo, a P815. Nossos experimentos iniciais concentraram-se em validar um método que nos permitisse acompanhar, com precisão e rapidez, a proliferação desta linhagem. Em consulta à literatura, verificamos existir um método colorimétrico (Kueng *et al.*, 1989) baseado na coloração pelo cristal violeta que nos pareceu

atraente. Incluindo pequenas modificações, padronizamos este ensaio para uso no nosso laboratório. Há uma correlação nítida entre o número de células e a densidade óptica das amostras analisadas. Assim, o ensaio do cristal violeta mostrou-se muito vantajoso, por ser um método de grande facilidade, rapidez e reprodutibilidade, permitindo a avaliação de grande número de amostras num único ensaio. Em segundo lugar, decidimos usar como controle positivo de atividade antiproliferativa, a cicloheximida, um inibidor de síntese proteica. É importante ressaltar que através do método utilizado, células expostas à cicloheximida não proliferaram, mas continuam viáveis durante todo o experimento.

Estabelecido o método e os controles positivo e negativo, passamos a estudar a universalidade do efeito do NO sobre a proliferação de células. Para tanto, utilizamos uma segunda linhagem de mastocitoma, a MCP-5 além da P815. Primeiramente, avaliando diferentes concentrações de SNAP, um doador clássico de NO, mostramos que o efeito anti-proliferativo é concentração-dependente em ambas as linhagens. O efeito anti-proliferativo causado pelo SNAP foi bastante acentuado, sendo que o número de células encontrado no grupo incubado com 100  $\mu$ M do composto foi de apenas 50% do grupo controle (sem doador de NO). Em segundo lugar, este efeito inibitório manteve-se ao longo de 48 h, indo até 72 h, após o que inicia-se a morte de grande número de células, mesmo nos grupos controle. Em função disso, e para facilitar os experimentos, escolhemos o prazo de 24 h como ponto de término de todos os demais experimentos. Portanto, o efeito anti-proliferativo do NO não parece exclusivo para uma única linhagem celular.

A seguir, investigamos se o efeito poderia ser causado por outras classes de doadores de NO e se o restante da molécula dos doadores utilizados causaria algum

efeito na proliferação. Primeiramente, observamos que o GSNO inibiu a proliferação celular de maneira concentração-dependente, porém com potência 100 vezes menor que a do SNAP. Esta diferença pode ser explicada devido à lenta cinética de liberação do NO pelo GSNO ( $t_{1/2}$  de várias horas) quando comparado ao do SNAP ( $t_{1/2}$  de 1,3 h; Arnette & Stamier, 1995). Em segundo lugar, observamos que o efeito anti-proliferativo deveu-se exclusivamente ao NO, uma vez que tanto o NAP como o GSH foram destituídos deste efeito. Por outro lado, a aparente inibição da proliferação causada pelo SNP foi, na verdade, causada por um marcado efeito citotóxico (cerca de 40% de morte celular, medida pelo método do Azul de Trypan). A liberação do NO pelo SNP ocorre de forma muito muito rápida ( $t_{1/2}$  de minutos), simultânea à de cianeto, produzindo severos danos celulares (para revisão ver Katayama, 1995), o que pode ter levado ao efeito citotóxico causado pelo SNP. Diante dos resultados obtidos destes experimentos, o SNAP foi escolhido, entre os doadores de NO apresentados, para realização dos demais experimentos.

É bem descrito na literatura que o espectro de ação de NO é dependente da sua concentração, isto é, concentrações baixas podem induzir efeitos que podem ser até antagônicos aqueles causados por altas concentrações de NO. Inúmeros exemplos deste padrão são encontrados na literatura, tais como na resposta inflamatória (Clancy *et al.*, 1998) e na neurotransmissão (Dawson & Dawson, 1996). Nossos dados confirmam este perfil do NO, no sentido que ele em baixas concentrações inibiu a proliferação das linhagens utilizadas, enquanto que em altas concentrações causou citotoxicidade. Assim parece que alguns dos mecanismos ativados pelo NO para levar à interrupção do crescimento celular das linhagens aqui usadas possam também estar causando a morte das células. Para nos certificarmos

de que nossos dados sempre expressavam os efeitos do NO na proliferação, usamos apenas as concentrações citostáticas, além de fazer um acompanhamento sistemático da viabilidade celular durante os experimentos.

Alguns dos efeitos mediados pelo NO são atribuídos ao ânion peroxinitrito, resultante da sua reação com o ânion superóxido (Beckman & Koppenol, 1996). Como alguns destes efeitos incluem citotoxicidade e citostase para células de mamíferos e bactérias, pareceu-nos importante avaliar se o efeito anti-proliferativo do NO envolvia a participação do peroxinitrito. Utilizando o SIN-1, um doador de peroxinitrito, nossos resultados mostram claramente que o peroxinitrito não parece ser o efector primário da ação anti-proliferativa do NO, pelo menos sobre as linhagens aqui utilizadas.

A maioria, senão a totalidade, dos efeitos não-citotóxicos mediados pelo NO, incluindo agregação plaquetária e relaxamento da musculatura lisa vascular, são reversíveis. Como o efeito anti-proliferativo visto nos nossos experimentos em baixas concentrações de NO também ocorre fisiologicamente (p. ex., células musculares lisas; Garg & Hassid, 1993), investigamos a reversibilidade deste efeito anti-proliferativo. Como a redução da proliferação ocorreu igualmente caso o doador permanecesse em contacto com as células por 24 h ou fosse removido após um contacto breve de apenas 4 horas, podemos afirmar que este efeito do NO foi irreversível. Este resultado é relativamente surpreendente, dada a natureza transitória da grande maioria dos efeitos causados por *baixas concentrações* de NO. Este achado mostra claramente que as células não têm como sobrepujar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qua(is) o NO inibe a proliferação celular, pelo menos no período experimental de 24 h. Além disso, há que se considerar o seguinte: i) a

presença das células foi determinante para a liberação do NO; ii) na presença das células, boa parte, mas não a totalidade do NO, foi liberado nas primeiras horas de incubação e iii) a retirada do NO após 4 h de incubação não restabeleceu a proliferação normal das células observada em 24 h. Assim, o mecanismo inibido (ou ativado) pelo NO não parece depender da total liberação desta molécula e nem da sua presença física durante todo o período de tratamento para inibir a proliferação celular. Como NO interage com sulfidrilas presentes em proteínas (Stamler *et al.*, 1992a) e como a liberação do NO foi acelerada pela presença de células, pode-se pensar que a interação do NO com sulfidrilas de membrana possa explicar a maior decomposição do doador de NO.

A maioria das assim chamadas “ações fisiológicas” do NO (vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, por exemplo) são mediadas através da ativação da sGC (Ignarro, 1991), com conseqüente formação de cGMP (para revisão ver McHugh, 1998) e ativação de proteínas quinases, principalmente a PKG (Lucas *et al.*, 2000). Assim, investigamos se o efeito anti-proliferativo do NO poderia ser mediado pela ativação da GC, usando um inibidor potente e seletivo para a forma solúvel desta enzima, ODQ (Garthwaite *et al.*, 1995). Nossos resultados mostram que este efeito do NO não depende da ativação da sGC. Como o cGMP também pode ser formado pela ação da GC particulada (embora o NO não a ative) e para descartar totalmente algum papel do cGMP no processo de inibição da proliferação, usamos o 8-Br-cGMP, um análogo permeante do cGMP. Este experimento somente referendou que o efeito anti-proliferativo do NO, pelo menos nas nossas linhagens, foi independente de GC e/ou cGMP. Relatos da literatura mostram que a PKG (proteína quinase G ou quinase dependente de cGMP) tem papel na proliferação e

diferenciação celular (veja por exemplo a revisão de Ruth, 1999). Nossos resultados divergem com os desta linha uma vez que, nas nossas mãos, o efeito antiproliferativo do NO não foi via cGMP/PKG. Uma das possibilidades para explicar este resultado seria que para células normais o efeito do NO seria dependente de cGMP, mas isto não seria válido para células tumorais. Por outro lado, também existem relatos mostrando resultados similares aos nossos como, por exemplo, de que o efeito anti-proliferativo do NO em células musculares lisas de vasos é independente da ativação de GC (Ignarro *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, tem ficado aparente que boa parte dos efeitos do NO podem ser causados por dois mecanismos gerais. O primeiro deles envolve a modificação de proteínas por S-nitrosilação de sulfidrilas em resíduos de cisteína, formando os assim chamados nitrosotióis. Os nitrosotióis são mais estáveis que o próprio NO (para uma revisão ver Gaston, 1999). Por exemplo, os efeitos dos nitratos orgânicos (vasodilatadores utilizados no tratamento de angina e hipertensão; Fung & Bauer, 1994) envolvem a formação de S-nitrosotióis, que se decompõem espontaneamente, liberando NO.

O segundo mecanismo geral de ação do NO é pela ativação de canais de K<sup>+</sup>, dentre os quais os dependentes de cálcio (BK<sub>Ca</sub>; Williams *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1993). Esta ativação pode ser feita diretamente pela S-nitrosilação de cisteínas de canais (Bolotina *et al.*, 1994) ou pela ativação de canais mediada por segundos mensageiros formados em resposta ao NO, incluindo o cGMP (para revisão Lucas *et al.*, 2000). Por outro lado, encontra-se na literatura a descrição de que canais iônicos, incluindo os canais de potássio estão envolvidos na proliferação celular. Um exemplo é o relato mostrando que estes canais são expressos ou ativados em

determinadas fases do ciclo celular, garantindo a progressão do ciclo (Wonderlin & Strobl, 1996). Juntando estas informações, investigamos se uma ação do NO nos canais de  $K^+$  poderia explicar seu efeito anti-proliferativo. Para termos uma visão mais geral da importância destes canais, utilizamos inicialmente o TEA, que nos confirmou o envolvimento destes canais. Em seguida, iniciamos uma análise mais minuciosa para identificar o subtipo de canal envolvido neste efeito do NO. Estes experimentos indicaram que canais de potássio dependente de voltagem- e dependente de cálcio são afetados por NO, mas não o canal de potássio ATP-dependente. Pelo menos dois pontos importantes parecem-nos dignos de discussão. Primeiro, as concentrações efetivas dos bloqueadores de canal de potássio necessárias para reverter o efeito do NO em nossos experimentos estão abaixo das concentrações efetivas normalmente descritas na literatura. Isto sugere que o envolvimento destes canais, no efeito anti-proliferativo do NO, deva ser um evento central, dada à sua sensibilidade aos bloqueadores de canais de potássio. Segundo, quando altas concentrações como as sugeridas pela literatura foram usadas *na ausência* de NO, não houve qualquer interferência com a proliferação de células P815 (resultados não mostrados). Isto, portanto, indica que canais de potássio não parecem estar envolvidos na proliferação normal desta linhagem celular e que o efeito inibitório dos bloqueadores, na ação anti-proliferativa do NO, não pode ser atribuída a um efeito inespecífico. Portanto, o resultado global destes experimentos mostra que os canais de potássio sensíveis a voltagem e cálcio-dependentes estão envolvidos no efeito anti-proliferativo do NO.

Considerando que o efeito anti-proliferativo do NO mostrou-se irreversível e levando-se em consideração a importância dos canais de potássio no seu efeito,

resolvemos averiguar se os canais estavam sendo ativados logo no início da ação do NO e se eles participavam continuamente do processo de diminuição da proliferação celular. Assim, a co-incubação dos bloqueadores relevantes juntamente com o NO reverteu seu efeito anti-proliferativo, mesmo quando todos os compostos (inclusive o NO) foram incubados por apenas 4 h. Mais ainda, a adição dos bloqueadores após a remoção do NO mostrou que o efeito do NO pôde ser revertido. Esses últimos resultados demonstram que a redução da proliferação celular causada pelo NO demanda ativação persistente dos canais de potássio desde os tempos iniciais da ação do NO. Neste sentido, é possível pensar que o NO seria importante no início do processo anti-proliferativo através da sinalização de canais de potássio sensíveis à voltagem e de canais de potássio dependentes de cálcio que, por sua vez, desencadeariam outros mecanismos intracelulares responsáveis pela redução da proliferação celular.

Como o NO reage avidamente com tióis, originando S-nitrosotióis, e os canais de potássio têm cisteínas reativas em sua seqüência, é possível pensar que a nitrosilação destas sulfidrilas induza mudanças conformacionais que conservariam os canais no estado aberto. Como é sabido, a abertura de canais de potássio hiperpolariza a membrana plasmática, induzindo entre outras o fechamento de canais de cálcio dependentes de voltagem. A proliferação celular é modulada por processos sensíveis à alteração das concentrações de cálcio intracelular e bloqueadores de canais de cálcio inibem, por exemplo, a síntese de DNA e a proliferação de células musculares lisas (para revisão ver Schmitz *et al.*, 1991). Se isto é verdade no nosso caso, esta diminuição na sinalização de cálcio poderia explicar pelo menos parte dos efeitos do NO.



Várias proteínas participam da regulação de componentes essenciais do citoesqueleto, estrutura essencial para a proliferação celular (Sorger *et al.*, 1997), como os filamentos intermediários e a associação entre a actina e miosina. Dados da literatura mostram que o NO pode afetar o citoesqueleto (Eiserich *et al.*, 1999). As proteínas que o compõem possuem sulfidrilas que poderiam servir de alvo para a ação do NO. Portanto, em princípio o efeito anti-proliferativo do NO poderia estar também relacionado ao citoesqueleto. Nossos resultados entretanto, sugerem não haver qualquer relação entre o efeito anti-proliferativo do NO e o citoesqueleto, durante os tempos analisados, uma vez que mesmo com a desorganização do citoesqueleto da célula causada pela presença dos vários agentes despolimerizantes, o NO continua exercendo efeito antiproliferativo de forma inalterada. Portanto, como alterações no citoesqueleto não inibiram nem potencializaram a ação anti-proliferativa do NO podemos concluir que este efeito do NO não depende daquela estrutura celular.

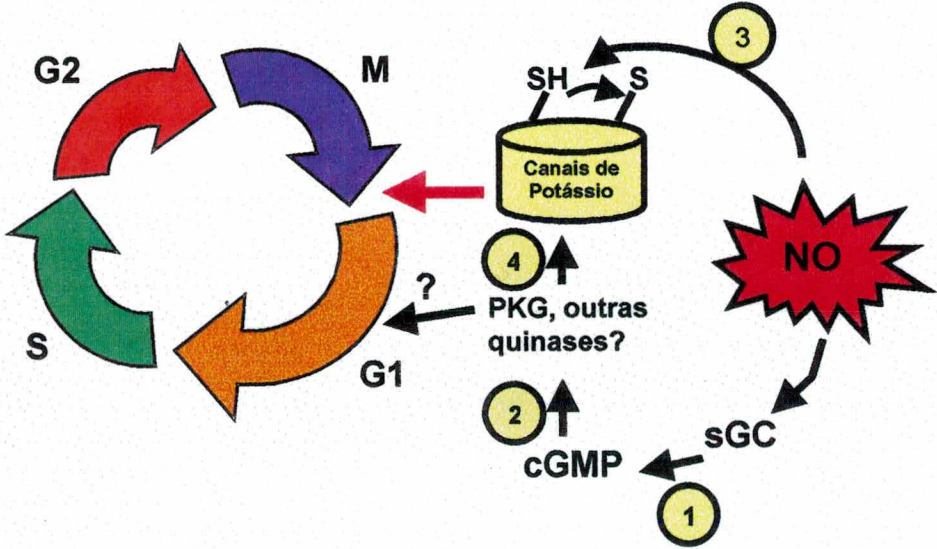
O NO pode alterar a expressão ou atividade de proteínas formadoras de complexos (ciclina/Cdk) que regulam o ciclo celular inibindo a proliferação (Guo *et al.*, 1997). Como o NO causou um aumento substancial do número de células em metáfase, este resultado sugere que pelo menos parte do efeito do NO possa ser mediado pela sua ação em proteínas envolvidas no ciclo celular, e que isto possa estar ocorrendo através de canais de  $K^+$ .

### **Considerações Finais**

Um resumo dos nossos dados e a sua colocação no contexto atual está mostrado no Esquema 4. Estudos na literatura mostram que o NO inibe a proliferação celular através da ativação da enzima guanilato ciclase e subsequente

produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP; Passo 1). Este segundo mensageiro ativa uma proteína quinase (Proteína Quinase G, PKG), responsável pela maioria das ações do cGMP (Passo 2). Outros trabalhos mostram que canais de potássio podem ser nitrosilados por ligação do NO com sulfidrilas presentes em resíduos de aminoácidos da cadeia proteica do canal (Passo 3). Além disso, está mostrado que estes canais podem ser fosforilados por diversas quinases, entre elas a PKG, levando à alterações da sua funcionalidade (Passo 4). Portanto, nossos dados indicam que o efeito anti-proliferativo do NO pode ser atribuído ao seu efeito sobre canais de potássio, mais especificamente em dois subtipos destes canais: os canais de  $K^+$  dependentes de cálcio de alta e baixa condutâncias e os canais de  $K^+$  sensíveis à voltagem. Em continuação, nossos dados também mostram que este efeito do NO é independente da guanilato ciclase e da proteína quinase G.

Se estes achados puderem ser confirmados para outros tipos celulares, pode ser que eles sugiram novas medidas terapêuticas para o tratamento de patologias que envolvam distúrbios em proliferação celular, tais como câncer e aterosclerose.



Esquema 4 – Hipótese do mecanismo de ação do óxido nítrico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABELL, T.J.; RICHARDS, A.M.; IKRAM, H.; ESPINIER, E.A.; YANDLE, T. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 160:1392-1396, 1989.
- ALBINA, J.E.; REICHNER, J. S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. **Cancer Metastasis Rev.**, 17:39-53, 1998.
- ARNAL, J.F.; YASMIN, J.; DOCKERY, S.; HARRISON, D.G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. **Am. J. Physiol.**, 267:C1381-1388, 1994.
- ARNELLE D.R.; STAMLER, J.S. NO<sup>+</sup>, NO<sup>•</sup>, and NO<sup>-</sup> donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318:279-285, 1995.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87:1620-1624, 1990.
- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, 271:C1424-1437, 1996.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 362:850-853, 1994.
- BOND, C.T.; SPRENGEL, R.; BISSONNETTE, J.M.; KAUFMANN, W.A.; PRIBNOW, D.; NEELANDS, T.; STORCK, T.; BAETSCHER, M.; JERECIC, J.; MAYLIE, J.; KNAUS, H.G.; SEEBURG, P.H.; ADELMAN, J.P. Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel subunit, SK3. **Science**, 289: 1942-1946, 1997.
- BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23:1069-1076, 1996.
- BROILLET, M.C. S-Nitrosylation Of Proteins. **Cell. Mol. Life Sci.**, 55:1036-1042, 1999.

- BRUGNARA C.; FRANCESCHI, L.; ARMSBY, C.C.; SAADANE, N.; TRUDE, M.; BEUZARD, Y.; RITTENHOUSE, A.; RIFAI, N.; PLATT, O.; ALPER, S.L. A new therapeutic approach for sickle cell disease. Blockade of the red cell  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channel by clotrimazole. **Ann. NY Acad. Sci.**, 763: 262-271, 1995.
- BÜLT, H.; Nitric oxide and atherosclerosis: possible implications for therapy. **Mol. Med. Today**, 2:510-5118, 1996.
- BUTLER, A.R.; RHODES, P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal. Biochem.**, 249:1-9, 1997.
- CAMPBELL, D.; STAMLER, J.S.; STRAUSS, H. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes-dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **J. Gen. Physiol.**, 108:277-293, 1996.
- CATTERALL, W.A.; SNUTCH, T.P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 625:174-180, 1991.
- CHANDY, K.G.; CcCOURSEY, T.E.; CABALAN, M.D.; McLAUGHLIN, C.; GUPTA, S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. **J. Exp. Med.**, 160:369-385, 1984.
- CHERRY, P.D.; FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 79:2106-2110, 1983.
- CLANCY, K.G.; DECOURSEY, T.E.; CAHALAN, M.D.; GUPTA, S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. **J. Exp. Med.**, 160:369-385, 1984.
- COOKE, J.P.; DZAU, V.J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu. Rev. Med.**, 48:489-509, 1997.
- CORELL, T.; PEDERSEN, S.B.; LISSAU, B.; MOILANEN, E.; METSÄ-KETELÄ, T.; KANKAANRANTA, H.; VUORINEN, P.; VAPAATALO, H. RYDELL, E.; ANDERSSON, R.; MARCINKIEWICZ, E.; DORBUT, R.; GRYGLEWSKI, R.J. Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol. J. Pharmacol.**, 46:553-566, 1994.

- CRANE, B.R.; ARVAI, A.S.; GACHHUI, R.; WU, C.; GHOSH, D.K.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; Tainer, J. A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science**, 278:425-431, 1997.
- DALLOZ, F.; MAUPOIL, V.; LECOUR, S. ; BRIOT, F.; ROCHETTE, L. *In vitro* studies of interactions of NO donor drugs with superoxide and hydroxyl radicals. **Mol. Cell. Bioch.**, 177:193-200, 1997.
- DAWSON, T.M.; DAWSON, U.T. Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. **Annu. Rev. Med.**, 47:219-227, 1996.
- DENHAM, S. ROWLAND, I.J. Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophages: the role of nitric oxide. **Clin. Exp. Immun.**, 87:157-162, 1992.
- DO, K.; BENZ, B.; GRIMA, G.; GUTTECK-AMSLER, U.; KLUGE, I.; SALT, T. Nitric oxide precursor arginine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function. **Neurochem. Int.**, 29:213-224, 1996.
- EISERICH, J. P.; ESTEVEZ, A. G.; BAMBERG, T.V.; YE, Y.Z.; CHUMLEY, P.H.; BECKMAN, J.S.; FREEMAN, B.A. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, 96:6365-6370, 1999.
- FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine: X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 100:249-250, 1978.
- FORD, J.B. The earliest views. **Sci. Am.**, 278:50-53, 1998.
- FUJINO, K.; NAKAYA, S.; WAKATSUKI, T.; MIYOSHI, Y.; NAKAYA, Y.; MORI, H.; INOUE, I. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca(++)-mobilization, Ca(++)-activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 256:371-377, 1991.
- FUNG, H.L.; BAUER, J.A. Mechanisms of nitrate tolerance. **Cardiovasc. Drugs. Ther.**, 8:489-499, 1994.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288:372-376, 1980.

- GALIGNIANA, M.D.; PIWIEN-PILIPUK, G.; ASSREUY, J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. **Mol. Pharmacol.**, 55:317-3236, 1999.
- GARG, U.C.; HASSID, A. Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generation vasodilators. **Am. J. Physiol.**, 257:60-66, 1989a.
- GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and S-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, 83:1774-1777, 1989b.
- GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 171:474-479, 1990.
- GARG, U.C.; HASSID, A. Mechanisms of nitrosothiol-induced antimitogenesis in aortic smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 237:243-249, 1993.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48:184-188, 1995.
- GASTON, B.; SEARS, S.; WOODS, J.; HUNTS, J.; PONAMAN, M.; MCMAHON, T.; STAMLER, J. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. **Lancet**, 351:1317-1319, 1998.
- GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochim. Biophys. Acta.**, 5:1411:323-333, 1999.
- GIOVANNONI, G.; LAND, J.; KEIR, G.; THOMPSON, E.; HEALES, S. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. **Ann. Clin. Biochem.**, 34:193-198, 1997.
- GORDGE, M.P.; ADDIS, P.; NORONHA-DUTRA, A.; HOTHERSALL, J.S. Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione, **Biochem. Pharmacol.**, 55:657-665, 1998.
- GREEN, L.C.; LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78:1764-7768, 1981a.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Sci. Wash. DC**, 212:56-58, 1981b.

- GUO, K.; ANDRÉS, V.; WALSH, K. Nitric oxide-induced downregulation of cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, 97:2066-2072, 1998.
- HIBBS, J.B.JR.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Sci. Wash. DC**, 235:437-476, 1987.
- HIBBS, J.B.JR.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157:87-94, 1988.
- HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. **Heredity**, 6:261- 273, 1953.
- HUANG, Y; RANE, S.G. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. **J. Biol. Chem.**, 269: 31183-31189, 1994.
- IGNARRO, L.; LIPPTON, H; EDWARDS, J.; BARICOS, W.; HYMAN, A.; KADOWITZ, P.; GRUETTER, C. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 218: 739- 749, 1981.
- IGNARRO, L.J.; DEGNAN, J.N.; BARICOS, W.H.; KADOWITZ, P.J.; WOLIN, M.S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochem. Biophys. Acta**, 718:49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BALLOT,B.; WOOD, K.S. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. **J. Biol. Chem.**, 259:6201-6207, 1984.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; BYRNES, R.; WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possiss identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246:218-226, 1988.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, 41:485-490, 1991.



- IGNARRO, L.J. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. **Adv. Pharmacol.**, 26:35-65, 1994.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WEI, L.H.; BAUER, P.M.; WU, G.; DEL SOLDATO, P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 98:4202-4208, 2001.
- JIA, L.; BONAVENTUR, J.; STAMLER, J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control, **Nature**, 380:21-26, 1996.
- KANKAANRANTA, H.; RYDELL, E.; PETERSSON, A. S.; HOLM, P.; MOILANEN, E.; CORELL, T.; KARUP, G.; VUORINEN, P.; PEDERSEN, S. B.; WENNMALM, A.; METSÄ-KETELÄ, T. Nitric oxide-donating properties of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives. **Br. J. Pharmacol.**, 117:401-406, 1996.
- KARUP, G.; PREIKSCHAT, H.; WILHELLMSEN, E.S., PEDERSEN, S.B.; MARCINKIEWICZ, E.; CIESLIK, K.; GRYGLEWSKI, R.J. Mesoionic oxatriazole derivatives: A new group of NO-donors. **Pol. J. Pharmacol.**, 117:401-406, 1994.
- KATAYAMA, Y. Nitric oxide: Mysterious messenger. **Dojindo Newsletter**, 1, 1995.
- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, 3:23-25, 1977.
- KHOLER, R.; ROBERDS, S.L.; TAMKUM, M.M.; GRONEMEIER, M.; AUGUSTIN, A.; ALBRECHT, B.; PONGS, O.; JOCKUSCH, H. Chromosomal mapping in the mouse of eight K<sup>+</sup> channel genes representing the four shaker-like subfamilies shaker, shab, shaw, and shal. **Genomics**, 18: 568-574. 1994.
- KOJDA, G.; NOACK, E. Effects of pentacrythryl-tetranitrate and isosorbide-5-mononitrate in experimental atherosclerosis. **Agents Actions Suppl.**, 45:201-206, 1995.
- KOWALUK, E.A.; FUNG, H.L. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for *in vitro* vascular relaxation by S-nitrosothiols. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 255:1256-1264, 1990
- KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.**, 182:16-19, 1989.

- KUKOVETZ, W.R.; HOLZMANN, S.; WURM, A.; POCH, B. Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 310:129-138, 1979.
- LANCASTER, J.R.JR.; Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, 91:8137-8141, 1994.
- LATORRE, R.; MILLER, C. Conduction and selectivity in potassium channels. **J. Membr. Biol.**, 71:11-30, 1983.
- LI, Z.; CHAPLEAU, M.W.; BATES, J.N.; BIELEFELDT, K.; LEE, H.C.; ABBOUD, F.M. Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. **Neuron**, 20: 039-1049, 1998.
- LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M. J.; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, 144:4794-4797, 1990.
- LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.**, 52:375-409, 2000.
- MacMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, 15:323-350, 1997.
- MAGNER, L.N. A history of medicine. New York: Marcel Dekker Inc.; 1992.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, 27:8706-8711, 1988.
- MAW, W.W.; SHIMIZU, T.; SATO, K.; TOMIOKA, H. Further study on the roles of the effector molecules of immunosuppressive macrophages induced by mycobacterial infection in expression of their suppressor function against mitogen-stimulated T cell proliferation. **Clin. Exp. Immunol.**, 156:4617-4621, 1997.
- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 358:127-133, 1998.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, 22: 477-481, 1997.

- McANDREW, J.; PATEL, R.P.; JO, H.; CIRBWEKKM T.; KUBCIKB, T.; MOELLERING, D.; WHITE, C.R.; MATALON, S.; DARLEY-USMAR, V. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. **Sem. Perinatol.**, 21:351- 366, 1997.
- McHUGH, J.; CHEEK, D.J. Nitric oxide and regulation of vascular tone: pharmacological and physiological considerations. **Am. J. Crit. Care.**, 7:131-142, 1998.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? **J. Clin. Invest.**, 100:2146-2152, 1997.
- MILLER, C. On overview of the potassium channel family. **Genome Biology**, 1: 0004.1-0004.5, 2000.
- MISTRY, D.K.; GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, 124:1131-1140, 1998.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, 12:365-372, 1988.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43:109-142, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, 49:137-142, 1997.
- MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. **Nature**, 374:131-134, 1995.
- MORRIS, S.M.JR.; TIMOTHY, R.B. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, 266:E829-839, 1994.
- MUIJSERS, R.B.; FOLKERTS, G.; HENRICKS, P.A.; SADEGHI-HASHJIN, G.; NIJKAMP, F.P. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. **Life Sci.**, 60:1833-1845, 1997.
- MURAD, F.; MITAL, C.K.; ARNOLD, W.P.; KATSUKI, S.; KIMURA, H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic Nucleotide Res.**, 9:145-158, 1978.

MURRAY, A.W. Creative blocks cell-cycle checkpoints and feedback controls, **Nature**, 359:599-604, 1992.

MURRAY, A.; HUNT, T. The cell cycle: an introduction. New York: W. H. Freeman and Co., 1993.

MYCHELL, H.H.; SHONLE, H.A.; GRINDLEY, H.S. The origin of nitrate in the urine. **J. Biol. Chem.**, 24:461, 1916.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, 6:3051-3064, 1992.

NAVEEN, A.; KYUNG-UP, M.; JOHN, J.C.; JOHNG, S.R.; DEAN, D.M. Immortalization of mouse bone marrow-derived mast cells with Ad12-SV40 virus. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 100:319-327, 1993.

OKADA, Y.; YANAGISAWA, T.; YAMAGISCHI, T.; TAIRA, N. K<sup>+</sup> channel-opening action and KRN2391-induced reduction of Ca<sup>2+</sup> sensitivity of arterial smooth muscle. **Arch. Internat. Pharmacod. Ther.**, 326:33-51, 1993.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327:524-526, 1987.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333:664-666, 1988.

PARTISETI, M.; CHOQUET, D.; DIU, A.; KORN, H. Differential regulation of voltage and calcium activated potassium channels in human B lymphocytes. **J. Immunol.**, 148:3361-3368, 1992.

PEUNOVA N.; ENIKOLOPOV G. Nitric Oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. **Nature**, 375:68-73, 1995.

RANE, S.G. The growth regulatory fibroblast IK channel is the predominant electrophysiological feature of rat prostate cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 269: 457-463, 2000.

ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K<sup>+</sup> channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 265:C299-C303, 1993.

- ROCKETT K.A.; AWBURN, M.M.; COWDEN, W.B.; CLARK I.A. Killing of *Plasmodium falciparum in vitro* by nitric oxide derivatives. **Infect. Immun.**, 59:3280-3283, 1991.
- RUTH, P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. **Pharmacol. Ther.**, 82:355-372, 1999.
- SCHLEIFER, K.W.; MANSFIELD, H.N. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. **J. Immunol.**, 151:5492-5503, 1993.
- SCHMITZ, G; HANKOWITZ, J; KOVACS, E.M. Celular processes in atherogenesis: potencial targets of  $Ca^{2+}$  channel blockers. **Atherosclerosis**, 88: 109-132.
- SCHULTZ, K.D.; SCHULTZ, K.; SCHULTZ, G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. **Nature** (Lond), 265:750-751, 1997.
- SHIEH, C.C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol. Rev.**, 52: 557-593, 2000.
- SINGH, R.J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, 271:18596-18603, 1996.
- SORGER, P.K.; DOBLES, M.; TOURNEBIZE, R.; HYMAN, A.A. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 9:807-814, 1997.
- STAMLER, J.S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D.; KEANEY, J.; VITA, D.; SINGEL, D.J.; VALERI, J.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as a S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89:7674-7677, 1992b.
- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, 258:1898-1902, 1992a.
- STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages Produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82:7738-7742, 1985.
- STUEHR, D.J.; GROSS, S.S.; SAKUMA, R.; LEVI, R.; NATHAN, C.F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of

- endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, 169:1011-1020, 1989a.
- STUEHR, D.J.; NATHAN, V.F.; Nitric oxide A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, 169:1543-1555, 1989b.
- TANIGUCHI, J.; FURUKAWA, K.I.; SHIGEKAWA, M. Maxi K<sup>+</sup> channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pflügers. Arch.**, 423:167-172, 1993.
- VAN DE LOOSDRECHT, A.A; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Meth.**, 141:15-22, 1991.
- VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N.V.; ADELMAN, J.P. Calcium activated potassium channels. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 8: 321-329, 1998.
- VON DER LEYEN, H.E.; GIBBONS, G.H.; MORISHITA, R.; LEWIS, N.P.; ZHANG, L.; NAKAJIMA, M.; KANEDA, Y.; COOKE, J.P.; DZAU, V.J. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92:1137-1141, 1995.
- WELLMAN, G.C.; BEVAN, J.A. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 274:47-53, 1995.
- WILLIAMS, D.L.JR., KATZ, G.M.; ROY-CONTANCIN, L.; REUBEN, J.P. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85:9360-9364, 1998.
- WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, 25:434-456, 1998.
- WONDERLIN, W.F.; STROBL J.S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. **Membrane Biol.**, 154:91-107, 1996.
- WULFF, H.; MILLER, M.J.; HANSEL, W.; GRISSMER, S.; CAHALAN, M.D.; CHANDY, K.G. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-

- conductance  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^{+}$  channel, IKCa1: A potencial immunosuppressant. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 97: 8151-8156, 2000.
- YANG, W.; ANDO, J.; KORENAGA, R.; TOYO-OKA, T.; KAMIYA, A. Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 203:1160-1167, 1994.
- YU, S.M.; HUNG, L.M.; LIN, C.C. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. **Circulation**, 95:1269-1277, 1997.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E.; AMERINI, S.; GRANGER, H.J.; MAGGI, C.A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial growth and migration in vitro promoted by substance P. **J. Clin. Invest.**, 94:2036-2044, 1994.